



Lídia Isabel da Silva Coito

Licenciatura em Bioquímica

Validação do potencial anti-tumoral de um composto de cobre e identificação dos seus alvos biológicos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Genética Molecular e Biomedicina

Orientadora: Maria Alexandra Núncio de Carvalho Ramos Fernandes, Professora
Doutora, FCT/UNL

Co-orientadora: Susana Isabel Rodrigues dos Santos, Professora Doutora,
FECN/ULHT

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Ilda Santos Sanches

Arguente: Prof. Doutor Pedro Viana Baptista

Vogal: Prof. Doutora Maria Alexandra Núncio de Carvalho Ramos
Fernandes



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2013

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

Lídia Isabel da Silva Coito

Licenciatura em Bioquímica

Validação do potencial anti-tumoral de um composto de cobre e identificação dos seus alvos biológicos

*Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre
em Genética Molecular e Biomedicina, pela Universidade Nova
de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia*

Orientadora:

Maria Alexandra Nuncio de Carvalho Ramos Fernandes,
Professora Doutora, FCT/UNL

Co-orientadora:

Susana Isabel Rodrigues dos Santos, Professora Doutora,
IST/UTL

No seguinte *Poster* encontra-se parte do trabalho apresentado nesta dissertação:

Silva, J. F., Silva, A. C., Luís, D. V., Santos, S., Mendo, A. S., Coito, L., Cabral, G., Videira, P., Rodrigues, A. S., Lasri, J., Charmier, A., Guedes da Silva, M. F. C., Ma, Z., Pombeiro, A. e Fernandes, A. R. 2013. Anti-proliferative activity and biological targets of Pt (II) and Cu(II) compounds.

Pode-se encontrar o mesmo em anexos nesta dissertação.

Validação do potencial anti-tumoral de um composto de cobre e identificação dos seus alvos biológicos

Copyright Lídia Coito, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Quero desde já deixar o meu sincero e profundo agradecimento à Professora Doutora Alexandra pela oportunidade cedida, por todo o apoio e dedicação, por toda a compressão e amizade que sempre demonstrou no decorrer deste trabalho.

À Professora Doutora Susana Santos agradeço o esforço e disponibilidade que sempre demonstrou ao longo deste trabalho, bem como a toda a ajuda necessária para a realização desta dissertação.

À Professora Doutora Guadalupe Cabral da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade Nova de Lisboa, gostaria de manifestar a minha gratidão pela disponibilidade e simpatia que sempre demonstrou e pela cooperação nos ensaios de citometria de fluxo.

Ao Miguel Larguinho pela disponibilidade e simpatia demonstrada e pelo valioso contributo na realização dos ensaios *Comet*.

À Joana Silva por toda a ajuda demonstrada e por a compreensão e disponibilidade apresentada no decorrer deste trabalho, por estar sempre disposta a ajudar e esclarecer qualquer dúvida existente a qualquer momento.

Aos meus colegas, Daniel Luís, Ana Silva, Vanda Marques, João Jesus, Catarina Rodrigues e Luís Raposo pela simpatia, ajuda e paciência diária. Agradeço particularmente, à Ana Mendo por toda a paciência e motivação que sempre demonstrou no decorrer de todos os ensaios realizados em conjunto.

À minha grande amiga Cláudia Pereira, um obrigado sentido por toda a amizade e força prestada durante toda esta grande e batalhadora caminhada. Pelos bons momentos que passamos juntas, por me ouvires nos bons e maus momentos e, acima de tudo, por estares sempre presente.

À minha família que sempre me apoiou e demonstrou o seu orgulho, um obrigado sincero. Em especial, aos meus pais Alice e António e à minha irmã Ana Cláudia por todo o carinho, amor e alegria que sempre demonstraram durante a realização da dissertação. Por estarem sempre perto, porque sem vocês não teria conseguido. Um obrigado especial, este trabalho também vos pertence.

A todos aqueles que me desejaram boa sorte, o meu muito obrigado!

Resumo

Em geral, muitos agentes quimioterapêuticos, utilizados atualmente na terapêutica do cancro, apresentam efeitos secundários adversos por serem citotóxicos não só para as células tumorais como para as células saudáveis. Assim, uma área de interesse passa pelo desenvolvimento de novos compostos com potencial anti-tumor de elevada especificidade para as células tumorais e que apresentem reduzidos efeitos secundários. Neste sentido, o objetivo principal desta dissertação consiste na determinação dos mecanismos e alvos biológicos subjacentes à ação de um composto de Cu, [Cu (4-metilbenzenosulfonato)₂ (4'-fenil-2,2':6',2''-terpiridina)], referido como ZM-II. Para tal, primeiramente procedeu-se à realização de ensaios de viabilidade celular em linhas tumorais e não-tumorais para a avaliação da citotoxicidade e citoseletividade deste composto. Os ensaios de viabilidade celular *in vitro* em linhas tumorais HCT116, HepG2 e MCF-7 indicaram que o composto apresenta elevada especificidade para as linhas tumorais HCT116 e HepG2. O potencial apoptótico foi avaliado por marcação com a sonda de Hoechst 33258 em células HCT116 e HepG2, onde se observou fragmentação e condensação nuclear, características do mecanismo de apoptose. No ensaio de dupla marcação da linha celular HCT116 com anexina V-FITC e IP observou-se, por citometria de fluxo a existência maioritária de células em apoptose tardia. Na medida em que o DNA é principal alvo intracelular primário de muitos compostos anti-tumorais, avaliou-se a interação do composto ZM-II com DNA por espectroscopia de absorção e EMSA. O valor de K_b foi de $1,73 (\pm 0,7) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, o que demonstra a elevada afinidade para o DNA. O ensaio EMSA na dependência do tempo permitiu inferir que o composto apresenta a capacidade de induzir quebras em cadeia dupla no DNA. Assim, procedeu-se à realização do Ensaio *Comet*, verificando que o composto ZM-II apresenta a capacidade de introduzir quebras na molécula de DNA com o aumento da concentração do mesmo. Com o objetivo de caracterizar em maior detalhe o modo de ação de ZM-II procurou-se identificar os seus alvos biológicos por análise do proteoma de linhas tumorais HCT116 expostas ao composto. Verificou-se que maioritariamente as proteínas identificadas estão envolvidas em mecanismos de resposta ao *stress* oxidativo, no processo apoptótico, na manutenção do citoesqueleto e na progressão/paragem do ciclo celular. A fim de detetar a formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) na presença do composto procedeu-se a análise da atividade da GST e peroxidação lipídica, verificando que o composto pode induzir o seu efeito anti-tumoral por formação radicais livres.

Palavras-Chave: Composto de Cobre, ZM-II, Atividade anti-tumoral, Citoseletividade, Alvos Biológicos, Interação com DNA, Proteoma, ROS.

Abstract

In general, many of the chemotherapeutic agents that are currently used in cancer therapy have adverse side effects, being cytotoxic not only to tumor cells but also to healthy cells. Thus emerges a new area of interest, the development of new compounds with potential antitumor properties, exhibiting high specificity for tumor cells and reduced/lower side effects to normal tissues/organs. The aim of this master thesis consists in evaluating the biological targets and mechanisms underlying the action of a compound of Cu, [Cu (4-metilbenzenosulfonato) 2 (4-phenyl-2', 2': 6', 2"-terpyridine)] referred as ZM-II. For this, we first evaluated the cell viability of tumor (HCT116, MCF-7 and HepG2) and non-tumor cell lines treated with the compound, in order to evaluate the cytotoxicity and cytoselectivity of this compound. In this regard, the compound exhibited high specificity for tumor cells lines HCT116 and HepG2. The apoptotic potential was initially evaluated by Hoechst 33258 staining in HepG2 and HCT116 cells, and nuclear fragmentation and condensation, characteristic of apoptosis mechanism were observed and afterwards confirmed by flow cytometry using double staining with Annexin V-FITC and PI in HCT116 cells. As it is well known that DNA is the major intracellular target of many antitumor compounds, therefore the interaction of compound ZM-II with DNA was evaluated by absorption spectroscopy and EMSA. The K_b value was $1.73 (\pm 0.7) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, which demonstrates high affinity of ZM-II for DNA. The EMSA time course assay allowed concluding that the compound exhibits the ability to induce double-strand breaks in pDNA. In order to verify that the compound ZM-II had the ability to introduce breaks in the DNA molecule in a concentration dependent manner Comet assay was performed. In order to characterize in more detail the mode of action of ZM-II I and to identify their biological targets, a proteomic analysis of HCT116 tumor cell lines exposed to the compound was performed. It was found that predominantly the identified deregulated proteins are involved in oxidative stress response, in the apoptotic process, maintenance cytoskeleton and progression/arrest of the cell cycle. In order to clarify the ability of ZM-II to induce the formation of reactive oxygen species (ROS) GST activity and lipid peroxidation were performed and correlating the induced apoptosis with ROS formation.

Keywords: Cancer, Copper Compounds, ZM-II, Antitumor activity, Cytoselectivity, Biological Targets, DNA Interaction, Proteome, ROS.

Índice Geral

Índice de Figuras	xvii
Índice de Tabelas.....	xxi
Lista de Abreviaturas.....	xxiii
Lista de Unidades	xxv
1. Introdução	1
1.1 O Cancro	1
1.2 Morte Celular	6
1.2.1 Apoptose.....	7
1.2.1.1 Via Extrínseca ou de Recetor de Morte Celular.....	9
1.2.1.2 Via Intrínseca ou Mitocondrial	10
1.2.1 Gene Supressor de Tumores.....	11
1.3 Ciclo Celular	12
1.4 Linhas Tumorais Humanas em Estudo	15
1.4.1 Carcinoma Coloretal Humano	15
1.4.2 Carcinoma Hepatocelular Humano	17
1.4.3 Adenocarcinoma da Mama.....	18
1.5 Terapêutica do Cancro	19
1.6 Agentes quimioterapêuticos	20
1.6.1 A Cisplatina	20
1.6.2 Doxorubicina	22
1.6.3 Compostos de Cobre	23
1.7 Introdução ao Tema da Tese.....	24
2. Materiais e Métodos	26
2.1 Composto em estudo	26
2.2 Estudo em Linhas Celulares Humanas.....	26
2.2.1 Cultura das Linhas Celulares Humanas.....	27
2.2.2 Manutenção das Linhas Celulares Humanas	27
2.3 Avaliação do Potencial Citotóxico	28
2.3.1 Ensaio de Viabilidade Celular	28
2.4 Avaliação do Potencial Apoptótico.....	29
2.4.1 Análise por microscopia de fluorescência de células marcadas com <i>Hoechst 33258</i>	29
2.4.2 Marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio (IP).....	30
2.5 Análise da expressão de genes envolvidos na apoptose	31

2.5.1 Extração do RNA Total	32
2.5.2 Síntese de cDNA.....	32
2.5.3 Amplificação de cDNAs de genes alvo por PCR em tempo real	33
2.6 Progressão do Ciclo Celular	35
2.7 Estudos da Interação do compostos ZM-II com o DNA.....	36
2.7.1 Espectroscopia de Absorção (Titulação UV)	36
2.7.2 Ensaio de Retardamento da Mobilidade Electroforética (EMSA)	37
2.7.2.1 Cultura de <i>Escherichia coli</i>	37
2.7.2.2 Extração de DNA Plasmídico (pBSKII)	37
2.7.2.3 Procedimento EMSA.....	38
2.7.2.4 EMSA na Dependência do Tempo	38
2.8 Detecção de quebras no DNA – Eletroforese em gel de célula única ou Ensaio Comet	38
2.8.1 Preparação das lâminas.....	39
2.8.2 Exposição das Células e Preparação das Amostras	39
2.8.3 Eletroforese Alcalina.....	40
2.8.4 Visualização e análise das lâminas	40
2.9 Análise Proteómica.....	40
2.9.1 Exposição das células ao composto ZM-II e extração dos extratos de proteína total	40
2.9.2 Focagem Isoelétrica (1ª Dimensão)	42
2.9.3 SDS-PAGE (2ª Dimensão)	42
2.9.4 Análise de géis bidimensionais - Procedimento	43
2.10 Detecção da Indução de Espécies Reativas de Oxigénio	44
2.10.1 Ensaio da Glutathione S-Transferase	44
2.10.2 Análise de Peroxidação lipídica - Método TBARS (Thiobarbituric acid reactive species).....	45
3. Resultados e Discussão	47
3.1 Avaliação do Potencial Citotóxico	47
3.2 Avaliação do Potencial Apoptótico	50
3.2.1 Marcação com a sonda de Hoechst 33258.....	50
3.2.2 Marcação com Anexina V-FITC e IP	53
3.3 Análise da Expressão de Genes Envolvidos Na Apoptose Através de RT-PCR.....	55
3.4 Progressão Do Ciclo Celular	59
3.5 Estudos de Interação do compostos ZM-II com o DNA.....	62
3.5.1 Espectroscopia de Absorção	62

3.5.2 Ensaio de Retardamento da Mobilidade Electroforética (EMSA)	64
3.5.2 EMSA na Dependência do Tempo	66
3.6 Detecção de quebras no DNA – Eletroforese em gel de célula única ou Ensaio Comet	67
3.7 Análise de Proteómica.....	71
3.8 Detecção da Indução de Espécies Reativas de Oxigénio	78
3.8.1 Ensaio da Glutathione S-Transferase (GST)	79
3.8.2 Análise de Peroxidação lipídica - Método TBARS (<i>Thiobarbituric acid reactive species</i>).....	81
4. Conclusão e Perspetivas Futuras	83
5. Referências Bibliográficas	85

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Incidência e mortalidade por tipo de cancro nos Estados Unidos. Estimativas referentes ao ano de 2013 e representando o número de novos casos e mortes por indivíduos (Adaptado de Siegel et al., 2013)	2
Figura 1.2 - Ilustração representativa do processo de tumorigénese. Uma célula normal obtém alterações no seu genoma, que devido à perda dos mecanismos de reparação é mantida como uma mutação. A consequente aquisição de novas mutações permite a aquisição de uma vantagem proliferativa, que por sua vez, leva à contínua mutagénese, e à adoção de características malignas (Adaptado de Austen <i>et al.</i> , 2007)	4
Figura 1.3 - Ilustração representativa das principais características adquiridas pelas células tumorais humanas durante o processo de tumorigénese (Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011)	5
Figura 1.4 - Esquema representativo das alterações morfológicas que ocorrem durante os mecanismos de morte celular: necrose e apoptose (Adaptado de Van der Meer <i>et al.</i> , 2010)	7
Figura 1.5 - Ilustração representativa das vias intrínseca e extrínseca da apoptose. A via extrínseca depende da ligação entre um recetor de morte celular e o seu ligando e encontra-se associada à via intrínseca através da proteína Bid, que por sua vez desencadeia a amplificação desta última via. A via intrínseca, por sua vez, é induzida dependendo da proporção entre a proteína anti-apoptótica Bcl-2 e pro-apoptótica Bax. Ambas as vias progridem até à etapa de execução que é gerida por caspases efetoras, como a caspase 3 (Adaptado de Favalaro <i>et al.</i> , 2012)	11
Figura 1.6 - Representação esquemática das fases do ciclo celular e os seus <i>checkpoints</i> (Adaptado de Garrett, 2001)	13
Figura 1.7 - A interação entre Cdks e as ciclinas envolvidas nas diferentes fases do ciclo celular (Adaptado de Garret, 2001)	15
Figura 1.8 - Ilustração da estrutura do complexo <i>cis</i> -diaminodicloro-platina (II), cisplatina (Hannon 2007)	21
Figura 1.9 - Estrutura molecular da doxorrubicina (Stiborova <i>et al.</i> , 2012).	23
Figura 1.10 - Estrutura molecular do composto de cobre [Cu (4-metilbenzenosulfonato) ₂ (4'-fenil-2,2':6',2''-terpiridina)], (ZM-II)	25
Figura 3.1 - Viabilidade celular das linhas celulares tumorais HCT116, HepG2 e MCF-7 após 48 horas de exposição ao composto ZM-II. A viabilidade celular foi determinada por MTS. Os valores apresentados são referentes à média de três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao erro padrão em relação à média (<i>p</i> value < 0,05). Os valores de viabilidade celular foram normalizados em relação às	

células incubadas sem composto, na presença de 0,1 % de DMSO (controle). As linhas a tracejado referem-se ao cálculo de IC₅₀ absoluto. 47

Figura 3.2 - Viabilidade celular das linhas celulares não-tumorais MCF-10A e fibroblastos após 48 horas de exposição ao composto ZM-II. A viabilidade celular foi determinada por ensaio MTS. Os valores apresentados são referentes à média de três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao erro padrão em relação à média (p value <0,05). Os valores de viabilidade celular foram normalizados em relação às células incubadas sem composto, na presença de 0,1 % de DMSO (controle). As linhas a tracejado referem-se ao cálculo do IC₅₀ absoluto. 49

Figura 3.3 – Células da linha tumoral HCT116 marcadas com a sonda nuclear Hoechst 33258 após tratamento com ou sem o composto ZM-II nas concentrações de 0,025, 0,05 e 0,1 µM, durante 48 horas: (A) Controle com DMSO a 0,1 % (v/v) e sem composto; (B) [ZM-II] a 0,025 µM; (C) [ZM-II] a 0,05 µM e (D) [ZM-II] a 0,1 µM. Os círculos brancos representam a fragmentação nuclear e os círculos vermelhos a condensação da cromatina. As imagens são representativas de três ensaios independentes. 52

Figura 3.4 – Células da linha tumoral HepG2 marcadas com a sonda nuclear Hoechst 33258 após tratamento com ou sem o composto ZM-II nas concentrações de 0,025, 0,05 e 0,1 µM, durante 48 horas: (A) Controle com DMSO a 0,1 % (v/v) e sem composto; (B) [ZM-II] a 0,025 µM; (C) [ZM-II] a 0,05 µM; e (D) [ZM-II] a 0,1 µM. Os círculos brancos representam a fragmentação nuclear e os círculos vermelhos a condensação da cromatina. As imagens são representativas de três ensaios independentes. 53

Figura 3.5 - Marcação dupla com Anexina V-FITC e IP para quantificação do nº de células em apoptose, inicial e tardia, e necrose, na ausência (controle com 0,1 % (v/v) de DMSO) ou presença do composto ZM-II nas concentrações de 0,05 e 0,1 µM, em células HCT116, por 48 horas. Os valores apresentados são referentes à média de três ensaios independentes. 54

Figura 3.6 - Distribuição das células pelas diferentes fases do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M). As células HCT116 foram sujeitas a um duplo bloqueio com Timidina 2 mM e, posteriormente, expostas a 0.1 % (v/v) de DMSO ou 0,05 µM de composto, por períodos de 8 h e 24 h. As amostras foram analisadas por ensaio de citometria de fluxo e tratadas através do programa Attune® Cytometric Software v2.1. Os histogramas são representativos de três ensaios independentes 56

Figura 3.7 - Percentagem de células nas fases G0/G1, S e G2/M, na presença do composto ZM-II na concentração de 0,05 µM ou na ausência do mesmo (0.1% (v/v) de DMSO), em células HCT116, por 8 h e 24 h. Os valores apresentados são referentes à média de três ensaios independentes 57

Figura 3.8 - Variação da expressão dos genes *BCL2*, *BAX* e *CASP3* em células HCT116 expostas a 0,05 µM de ZM-II ou DMSO a 0,1 % (v/v) (controle), por 48 horas. A quantificação foi realizada através da utilização do método comparativo de *threshold* (Ct). Os dados foram normalizados relativamente ao

controle interno (rRNA18SA). Os valores apresentados são referentes à média de três ensaios independentes 59

Figura 3.9 - Valores da razão Bax/Bcl-2 em células HCT116 expostas a 0,05 μM de ZM-II ou DMSO a 0,1 % (v/v) (controle), por 48 horas. Os valores apresentados são referentes à média de três ensaios independentes 61

Figura 3.10 - Variação da absorvância do composto ZM-II (5 μM) na região do UV, na ausência (linha a preto) e na presença de concentrações crescentes de CT-DNA (maior concentração de DNA representada pela linha vermelha), em tampão 5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7. Encontra-se também representada, no canto superior direito, a regressão linear que permite determinar o valor da constante de afinidade para o DNA (Kb). A seta indica a variação da absorvância com o aumento da concentração de DNA (0 a 27 μM). Os espectros são representativos de várias experiências independentes 63

Figura 3.11 - Eletroforese em gel de agarose a 0,7 % (p/v) dos produtos resultantes da incubação do composto ZM-II em concentrações crescentes (5 a 100 μM) e DNA plasmídico pBSKII. λ /HindIII – marcador de pesos moleculares; C – controle com DNA plasmídico pBSKII; C_{DMSO} – controle com DMSO a 1 % (v/v) na ausência do composto. Gráfico de barras mostra distribuição das três conformações do pDNA (superenrolada (Forma I), circular relaxada (Forma II) e a linear (Forma III)) em percentagem, obtida através da análise densitométrica do gel através do programa GelAnalyzer. A imagem do gel é representativa de várias experiências independentes 65

Figura 3.12 - Eletroforese em gel de agarose a 0,7 % (p/v) dos produtos resultantes da incubação do composto ZM-II e o DNA plasmídico pBSKII, dependente do tempo (1 a 48 h). λ /HindIII – marcador de pesos moleculares; C – controle com DNA plasmídico pBSKII; C_{DMSO} – controle com DMSO a 1 % (v/v) na ausência do composto. Gráfico de linhas mostra a distribuição das três conformações do pDNA (superenrolada (Forma I), circular relaxada (Forma II) e a linear (Forma III)) dependente do tempo, em percentagem, obtida através da análise densitométrica do gel através do programa GelAnalyzer. A imagem do gel é representativa de várias experiências independentes 66

Figura 3.13 - Células HCT116 analisados por ensaio *Comet*. A) Núcleo de uma células HCT116 controle negativo (sem adição do composto ZM-II ou DMSO), consistem numa cabeça com mínima ou nenhuma migração de DNA na região da cauda. B) Núcleo de uma células HCT116 exposta a 0,1 μM de composto ZM-II durante 24h a 37°C, consiste num cabeça com migração do DNA para a região da cauda, como resultado de quebras simples ou duplas na molécula de DNA 68

Figura 3.14 - Ensaio *Comet* para quantificação do níveis de DNA na cauda, na presença do composto ZM-II a 0,05 e 0,1 μM , 0,1 % de DMSO, sem composto e DMSO e 0,05 % (v/v) de H₂O₂, em HCT116. A quantificação foi feita no programa *CometScore* (Tritek) 70

Figura 3.15 - Representação gráfica da média da percentagem de DNA na cauda para cada uma das condições estudadas: controle, % (v/v) DMSO, % (v/v) H₂O₂, e na presença de composto a 0,05 e 0,1

μM , em células HCT116. O gráfico é representativo de três experiências independentes e as barras de erro correspondem ao desvio padrão em relação à média 71

Figura 3.16 - Ensaio da atividade da GST para análise de formação de ROS, na presença de composto ZM-II na concentração de $0,05 \mu\text{M}$ ou na ausência do mesmo (controle $0,1 \%$ (v/v) de DMSO) durante 24 h, no extrato de proteína total de células HCT116. O gráfico é representativo de três ensaios independentes 80

Figura 3.17 - Atividade da GST na presença de composto ZM-II na concentração de $0,05 \mu\text{M}$ ou na ausência do mesmo (controle $0,1 \%$ (v/v) de DMSO) durante 24 h, no extrato de proteína total de células HCT116. O gráfico é representativo de três ensaios independentes 81

Figura 3.18 - Ensaio da peroxidação lipídica para análise de formação de ROS, na presença de composto ZM-II na concentração de $0,05 \mu\text{M}$ ou na ausência do mesmo (controle $0,1 \%$ (v/v) de DMSO) durante 24 h, no extrato de proteína total de células HCT116. O gráfico é representativo de três ensaios independentes 83

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Propriedades do composto em estudo, ZM-II	26
Tabela 2.2 - Sequência dos <i>primers forward</i> e <i>reverse</i> e tamanho do amplicão para cada gene em estudo	35
Tabela 2.3 - Temperatura de <i>annealing</i> e concentrações utilizadas de primers <i>forward</i> e <i>reverse</i> e de MgCl ₂ para amplificação dos genes <i>RNA18S5</i> , <i>BAX</i> , <i>BCL-2</i> , <i>CASP-3</i>	35
Tabela 2.4 - Programa de PCR utilizado para amplificação dos genes <i>RNA18S5</i> , <i>BAX</i> , <i>BCL2</i> , <i>CASP-3</i> das amostras de cDNA	36
Tabela 2.5 - Condições utilizadas em cada um dos passos do programa de focagem isoeletrica	43
Tabela 2.6 - Quantidade da solução de substrato e enzima (amostra ou controlo) necessário para a realização da reação enzimática da GST, com um volume final de 200 µL	46
Tabela 3.1 - Percentagem de células viáveis, apoptóticas iniciais e tardias, e necróticas na ausência (controlo 0,1 % (v/v) de DMSO) ou presença do composto ZM-II nas concentrações 0,05 e 0,1 µM, em células HCT116, por 48 horas. Os valores apresentados são referentes à média de três ensaios independentes	54
Tabela 3.2 - Valores obtidos, pelo Ensaio <i>Comet</i> , de % de DNA na cauda para cada uma das condições estudadas: controlo, % (v/v) DMSO, % (v/v) H ₂ O ₂ , e na presença de composto a 0,05 e 0,1 µM, em células HCT116. Os valores são representativos de três experiências independentes e o desvio padrão são em relação à média	69
Tabela 3.3 - Proteínas identificadas nos géis obtidos por eletroforese bidimensional com o respectivo ponto isoeletrico (pI), massa molecular (Mm), expressão relativa para o composto ZM-II (em relação aos respectivos controlos). Os valores correspondem à média de três ensaios independentes. Valores inferiores a 0,7 foram considerados sub-expressão e valores superiores a 1,5 referem-se a sobre-expressão	73

Lista de Abreviaturas

Abs	Absorvância
Abs₂₆₀/Abs₂₃₀	Razão entre a absorvância medida a 260 nm e a absorvância a 230 nm
Abs₂₆₀/Abs₂₈₀	Razão entre a absorvância medida a 260 nm e a absorvância a 280 nm
APS	Persulfato de amônio, do inglês <i>Ammonium Persulfate</i>
Bis	N',N'- Metileno – Bisacrilamida, do inglês <i>N,N'-Methylenebisacrylamide</i>
ATP	5'-trifosfato de adenosina, do inglês <i>Adenosine-5'-triphosphate</i>
BAX	Gene que codifica para a proteína pro-apoptótica Bax, da família Bcl-2
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCL2	Gene que codifica para a proteína anti-apoptótica Bcl-2, da família Bcl-2
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma protein 2</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BSA	Albumina do Soro Bovino, do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
Ca²⁺	Di-catão de cálcio
CASP3	Gene que codifica para a protease de cisteína caspase-3
DNase I	Desoxirribonuclease
CDKN1A	Gene que codifica para a proteína p21
cDNA	DNA complementar, do inglês <i>complementar DNA</i>
CO₂	Dióxido de carbono
Cu	Átomo de Cobre
CT-DNA	DNA de timo de bezerro, do inglês <i>Calf Thymus-DNA</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMEM/F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12</i>
DMSO	Sulfóxido de dimetilo, do inglês <i>Dimethyl Sulfoxide</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DOX	Doxorrubicina
EMSA	Ensaio de Retardamento da Mobilidade Electroforética, do inglês <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
FBS	Soro Fetal Bovino, do inglês <i>Fetal Bovine Serum</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína, do inglês <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
HCT116	Linha celular do carcinoma coloretal humano
HepG2	Linha celular do carcinoma hepatocelular humano
IC₅₀	Concentração de composto inibitória de 50 % da viabilidade celular, do inglês <i>Inhibitory Concentration</i>
IP	Iodeto de Propídio, do inglês <i>Propidium Iodide</i>
Kb	Constante de afinidade para o DNA
KCl	Cloreto de potássio

MCF-10A	Linha celular saudável de células da glândula mamária
mRNA	RNA mensageiro
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
NaCl	Cloreto de sódio
PBS	Tampão de Fosfato Salino, do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
pBSKII	DNA plasmídico pBluescript II SK+
pH	Potencial de Hidrogénico iónico
PMS	Metossulfato de fenazina, do inglês <i>Phenazine Methosulphate</i>
Puma	<i>Bcl-2 binding component 3</i>
RNA	Ácido Ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio, do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-PCR	Transcritase reversa – reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida – Dodecil sulfato de sódio
SMAC/DIABLO	<i>Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct IAP-bind protein with low pI</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral, do inglês, <i>Tumor Necrosis Fator</i>
TP53	Gene supressor de tumores que codifica para a proteína p53
Tris-HCl	Tris-Hidroclorito
TEMED	N,N,N',N' - tetrametiletilenodiamina
UV	Ultravioleta
ZM-II	[Cu (4-metilbenzenosulfonato) ₂ (4'-fenil-2,2':6',2''-terpiridina)]

Lista de Unidades

A; mA	Amperes; miliamperes
m; cm; mm; nm	Metro; centímetro (10^{-2} m); milímetro (10^{-3} m); nanómetro (10^{-9} m)
M; mM; μM	Molar (mol/L); milimolar (10^{-3} M); micromolar (10^{-6} M)
mol; pmol	Mole; picomole
Kg; g; mg; μg	Quilogramas; grama (10^{-3} kg); miligrama (10^{-6} kg); micrograma (10^{-9} kg); ng – nanograma (10^{-12} kg)
h, min; s	Horas; minutos; segundos
kDa; Da	KiloDalton; Dalton (10^{-3} kg)
L; mL; μL	Litro; mililitro (10^{-3} L); μ L – microlitro (10^{-6} L)
pb	Pares de bases
rpm	Rotações por minuto
V	Volts
W	Watts
U	Unidade; mU – miliunidade
UA	Unidade de absorvância
°C	Graus Celcius
% (p/v)	Percentagem peso/volume
% (v/v)	Percentagem volume/volume

Lista de Símbolos

%	Porcentagem
[complexo]	Concentração de complexo
[DNA]	Concentração de DNA
Σ	Somatório
ϵ	Coeficiente de extinção molar
ϵ_a	Coeficiente de extinção molar aparente
ϵ_b	Coeficiente de extinção molar do composto ligado ao DNA
ϵ_f	Coeficiente de extinção molar do composto no estado livre
λ	Comprimento de onda
ℓ	Percurso ótico

1. Introdução

1.1 O Cancro

1.1.1 Incidência e Mortalidade

O cancro é considerado a segunda causa de morte a nível mundial, registando cerca de 8 milhões de mortes por ano (WHO, 2012; Jemal *et al.*, 2011; Fernandes, 2010; Ferlay *et al.*, 2007). Na atualidade é um problema crescente ao nível de saúde pública em países desenvolvidos e em vias de desenvolvimento sendo em parte o resultado do processo global de industrialização e urbanização, que levou a alterações das condições ambientais e como tal a uma adequação de estilo de vida da população nem sempre considerados saudáveis (Anand *et al.*, 2008; Surh, 2003; Jemal *et al.*, 2011; Fernandes, 2010). Por sua vez, a esperança média de vida aumentou e sendo que a incidência de cancro aumenta com a idade, e que a população dos países desenvolvidos encontra-se cada vez mais envelhecida, estima-se que no futuro o número de indivíduos afetados por cancro seja superior ao atual (WHO, 2012; Jemal *et al.*, 2011).

Na realidade, como resultado dessas tendências, estima-se que o número global de óbitos poderá atingir 55 milhões em 2030 (WHO, 2012). Durante os últimos 20 anos, tem-se verificado de fato, um aumento na incidência de cancro, o que é devido a diversos determinantes, entre os quais o crescimento e o envelhecimento da população e, também, aos comportamentos de risco adotados, como o tabagismo, as dietas alimentares desequilibradas e a falta de exercício físico (Bajetta *et al.*, 2007; Jemal *et al.*, 2011).

Os cancros mais comuns, e portanto, de maior incidência, são o cancro do pulmão (1,61 milhões de casos, 12,7 % de todos os casos de cancro), seguido pelo cancro da mama (1,38 milhões de casos, 10,9 % de todos os casos de cancro), e o cancro colorctal (1,23 milhões de casos, 9,7 % de todos os casos de cancro). Porém, os cancros que apresentam maior taxa de mortalidade são o cancro do pulmão (1,37 milhões de mortes, 18,2 % de todos os casos de cancro), estômago (736 mil de mortes, 9,7 % de todos os casos de cancro) e fígado (696 mil de mortes, 9,2 % de todos os casos de cancro) (Figura 1.1) (WHO, 2012; GLOBOCAN, 2012).

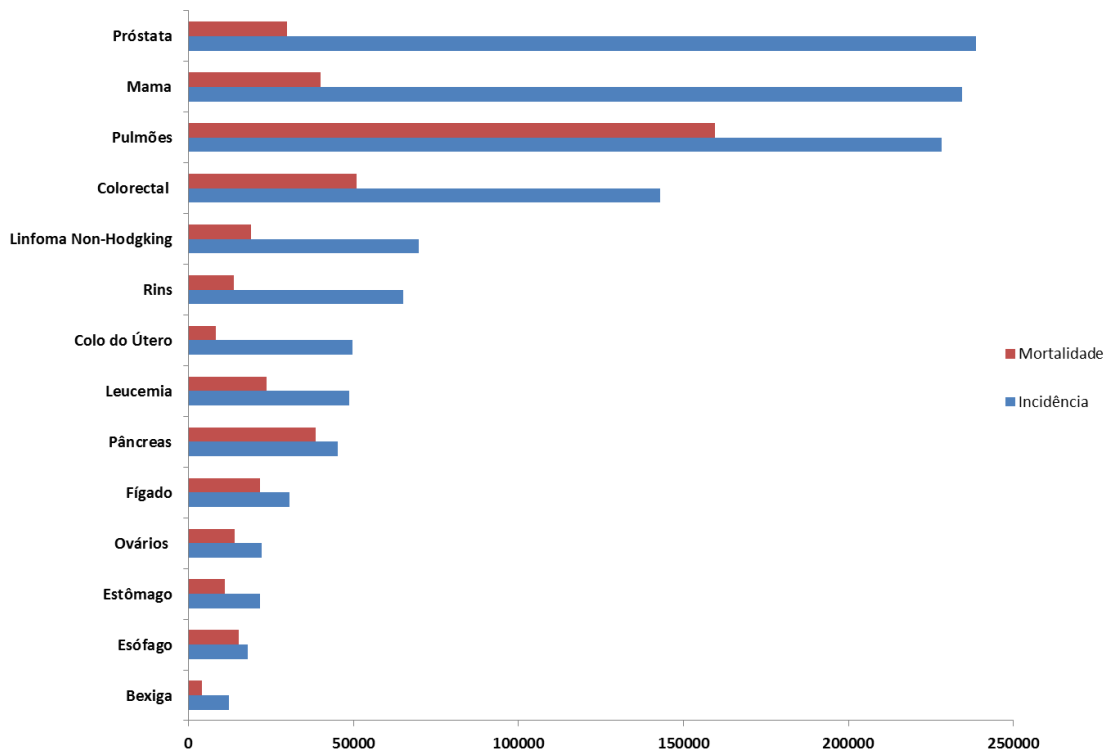


Figura 1.1 - Incidência e mortalidade por tipo de cancro nos Estados Unidos. Estimativas referentes ao ano de 2013 e representando o número de novos casos e mortes por indivíduos (Adaptado de Siegel *et al.*, 2013).

1.1.2 Tumorigénese

O cancro é considerado uma doença heterogénea resultante da aquisição de várias alterações genéticas e epigenéticas que resultam na típica desregulação da proliferação celular (Evan, 2001). Diariamente, milhões de células dividem-se no ser humano como resultado do desenvolvimento celular normal (Bertram, 2011). Porém, em cada divisão podem ocorrer erros, por desregulação da maquinaria celular ou por exposição a agentes carcinogénicos, e que desencadeiam a formação de células tumorais. O desencadear do processo tumorigénico pode dever-se a fatores internos, como por exemplo, mutações hereditárias, alterações hormonais e imunitárias, ou a fatores ambientais ou adquiridos, tais como o tabagismo, o alcoolismo, a obesidade, a dieta alimentar desequilibrada, a falta de exercício físico, poluentes ambientais, a radiação e os agentes infecciosos, entre outros. Estima-se que 5 a 10 % de todos os casos de cancro se devam a alterações genéticas, enquanto os restantes 90 a 95 % se devam ao ambiente envolvente e ao estilo de vida das populações, o que neste caso permite oportunidades na prevenção do cancro (Anand *et al.*, 2008).

A tumorigénese envolve a acumulação de pelo menos quatro a seis alterações genéticas não letais em genes essenciais, por exemplo ao nível do controlo da proliferação celular, da

estabilidade do genoma e da apoptose, o que confere à célula uma vantagem seletiva (Luo *et al.*, 2009; Croce, 2008; Chan *et al.*, 2004). Em resultado ocorre a acumulação de mutações, favorecida por danos nas vias de reparação do DNA, que impedem a reparação destas alterações por parte da célula (Teixeira, 2008; Robbins *et al.*, 2003). Os genes envolvidos durante a tumorigénese são os oncogenes e os genes supressores de tumores. Nas células tumorais os oncogenes derivam de proto-oncogenes ativados inadequadamente o como consequência de mutações de ganho de função ou, amplificação e que codificam produtos que desencadeiam o processo tumoral. Por sua vez, os genes supressores de tumores encontram-se inibidos devido a mutações de perda de função, deleção, e/ou silenciamento epigenético que à semelhança também induzem a progressão do processo tumoral (Lewin, 2004; Robbins *et al.*, 2003; Hanahan e Weinberg, 2000; Esteller *et al.*, 1999).

O processo tumorigénico compreende três fases (Figura 1.2): a iniciação, a promoção e a progressão (Kundu, 2004; Chan *et al.*, 2004; Surh, 2003). A fase de iniciação é irreversível e envolve a aquisição de danos na molécula de DNA, que por sua vez culminam na manutenção desses danos como uma mutação no genoma (Chan *et al.*, 2004). A fase de promoção é considerada uma fase de proliferação descontrolada (expansão clonal) destas células inicialmente alteradas (células pré-neoplásicas). Esta fase permite a ocorrência de alterações em cascatas de sinalização, o que por sua vez conduz à alteração da expressão de um conjunto de genes com papéis importantes na regulação da proliferação e crescimento celular, bem como no processo apoptótico e, desta forma, conferem uma vantagem seletiva às células iniciadas. Esta contínua expansão clonal cria o ambiente propício à aquisição de novas mutações que podem conduzir ao desenvolvimento das propriedades malignas, como a invasão e a metastização associadas à progressão do desenvolvimento tumoral (Chan *et al.*, 2004; Kundu, 2004).

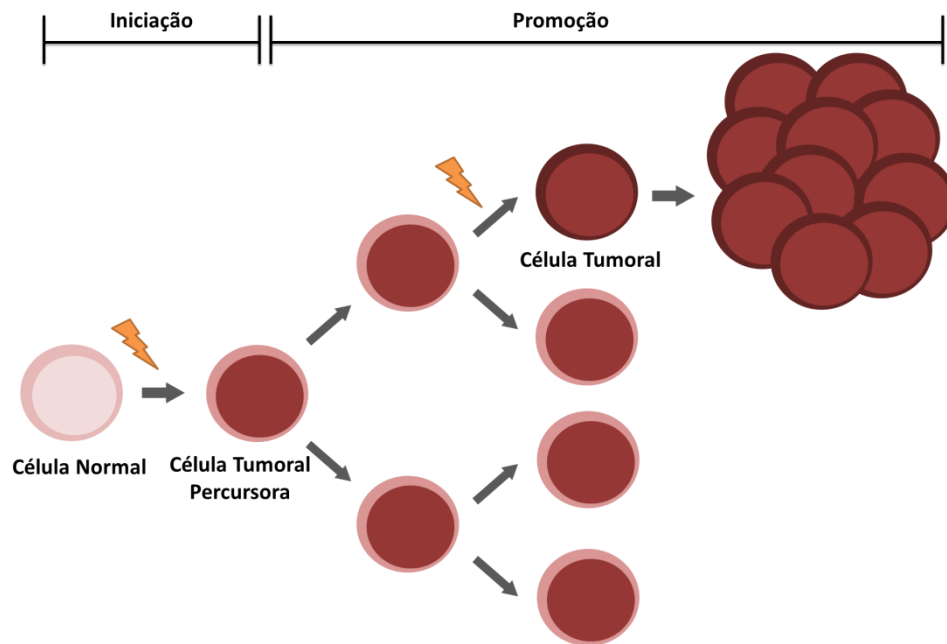


Figura 1.2 - Ilustração representativa do processo de tumorigênese. Uma célula normal obtém alterações no seu genoma, que devido à perda dos mecanismos de reparação é mantida como uma mutação. A consequente aquisição de novas mutações permite a aquisição de uma vantagem proliferativa, que por sua vez, leva à contínua mutagênese, e à adoção de características malignas (Adaptado de Austen *et al.*, 2007).

As células tumorais adquirem um conjunto de características durante o processo de desenvolvimento tumoral, tais como: um potencial replicativo ilimitado, auto-suficiência de fatores de crescimento, insensibilidade a inibidores de crescimento, evasão aos mecanismos de apoptose, indução da angiogênese e, por fim, capacidade de invasão e metastização (Figura 1.3) (Hanahan e Weinberg, 2011; Luo *et al.*, 2009).

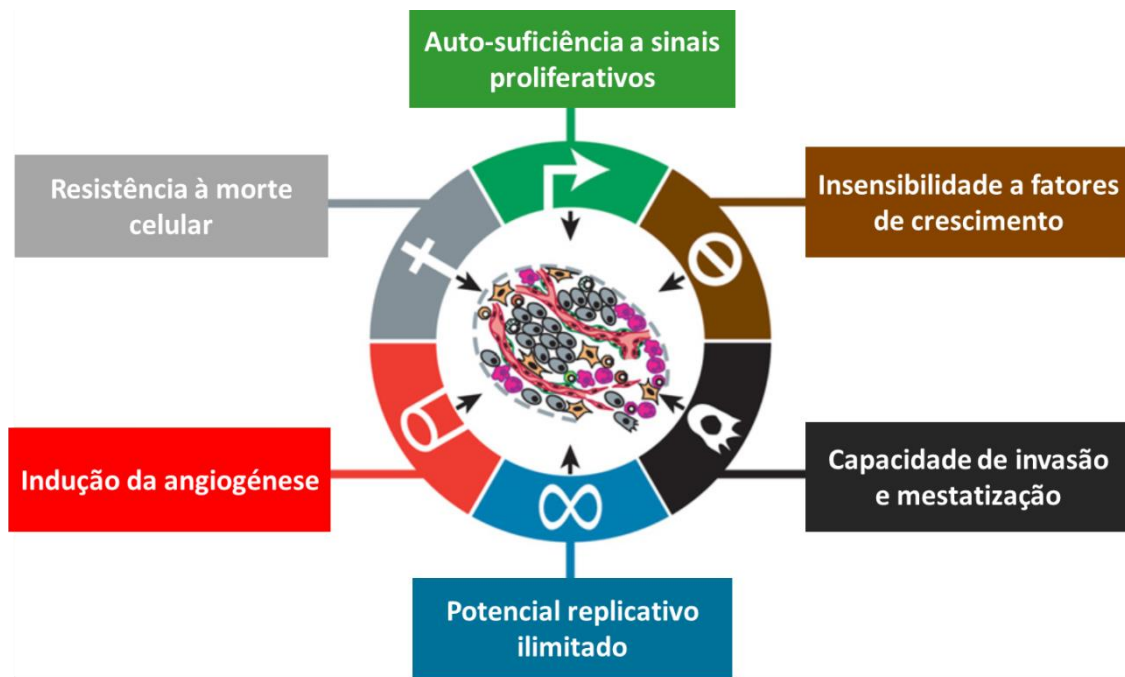


Figura 1.3 - Ilustração representativa das principais características adquiridas pelas células tumorais humanas durante o processo de tumorigênese (Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011).

A sustentação da sinalização da proliferação celular é uma das principais características adquiridas pelas células cancerígenas. Estas células apresentam uma sinalização e estimulação da proliferação celular independente do tecido normal circundante e coordenada pela produção dos seus próprios fatores de crescimento (Hanahan e Weinberg, 2000, 2011). As células dos tecidos normais controlam cuidadosamente a sinalização que promove a entrada ou a progressão do ciclo celular, assegurando assim a homeostasia celular e, portanto, a manutenção da arquitetura e função do tecido normal (Hanahan e Weinberg, 2011). A proliferação contínua das células cancerígenas é igualmente promovida devido à capacidade destas células em não responderem aos inibidores de crescimento celular. Assim, a sinalização da proliferação aumenta devido a alterações dos mecanismos de controlo de crescimento celular (Hanahan e Weinberg, 2000, 2011). A contínua proliferação celular característica das células cancerígenas leva à reprogramação do seu metabolismo energético, sendo que o ATP obtido por estas células provém da glicólise (Hanahan e Weinberg, 2011; Amaravadi e Thompson, 2007).

A progressão das células tumorais depende ainda da inibição do mecanismo de apoptose, que pode ocorrer através do aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas, tais como Bcl-2 (do inglês, *B-cell lymphoma protein 2*), ou pela diminuição da expressão de

proteínas pro-apoptóticas, como a Bax, (do inglês, *Bcl-2-associated X protein*), sendo a principal alteração ao nível da inibição do gene supressor de tumores *TP53* (Elmore, 2007).

Sabe-se que o aumento da atividade da enzima telomerase nas células cancerígenas está diretamente relacionado com a imortalização das mesmas na medida em que se verifica a manutenção do tamanho dos telómeros com consequente manutenção do potencial replicativo destas células (Hanahan e Weinberg, 2011; Amaravadi e Thompson, 2007).

A angiogénese, ou formação de novos vasos sanguíneos, é uma importante forma de promover um meio pelo qual as células cancerígenas obtêm oxigénio e nutrientes essenciais à sua função e sobrevivência, assim como eliminar os resíduos metabólicos e o dióxido de carbono (Garrett, 2001; Hanahan e Weinberg, 2000, 2011).

A aquisição das características de invasão e metastização pelas células cancerígenas são consequência de mutações em genes envolvidos na adesão celular, que desencadeiam a perda da inibição por contato e a promoção da migração destas células para locais distantes (Hanahan e Weinberg, 2011; Garrett, 2001). A formação de metástases está associada a 90 % de mortes por cancro em humanos (Hanahan e Weinberg, 2000).

1.2 Morte Celular

Milhões de células são eliminadas do organismo do ser humano, quer como resultado do desenvolvimento normal do mesmo, bem como em associação a uma patologia. O processo de morte celular pode ser realizado através de dois mecanismos principais: a apoptose e a necrose. Estes mecanismos apresentam entre si distintas características bioquímicas, morfológicas e funcionais, tal como representado na Figura 1.4 (Golstein e Kroemer, 2007; Orrenius, 2004; Formigli *et al.*, 2000). A necrose caracteriza-se como uma forma passiva de morte celular, não programada fisiologicamente, sem pré-determinação genética, independente de energia, resultando numa extensa lise celular que leva à promoção de uma resposta inflamatória no meio envolvente (Datta, 1999; Danial e Krosmeier, 2004). Contudo, autores defendem que a necrose é um processo programado uma vez que depende da ativação de cascatas de transdução de sinal específicas, que desencadeiam uma série de eventos intracelulares cumulativos (Golstein e Kroemer, 2007). Morfologicamente é caracterizada pela oncosse, isto é, um aumento do volume celular, dilatação dos organelos citoplasmáticos (mitocôndrias, retículo endoplasmático e aparelho de Golgi), condensação da cromatina, bem como a perda de integridade da membrana plasmática e consequentemente libertação do conteúdo celular no meio extracelular, com a promoção da resposta inflamatória, que por sua vez está relacionada com a promoção tumoral (Kroemer *et al.*, 2005;

Formigli *et al.*, 2000). A necrose é um mecanismo dependente da ocorrência de um dano externo, enquanto a apoptose pode ser desencadeada por estímulos internos ou externos (Ghobrial *et al.*, 2005; Lawen, 2003, Elmore, 2007).

Estudos recentes têm verificado que diferentes doses de compostos anti-tumorais podem desencadear tanto a morte celular por apoptose como por necrose, dependendo do tipo de célula e do grau de agressão exercida por estes. Neste âmbito, compostos anti-tumorais em concentrações relativamente baixas podem induzir morte celular por apoptose mas em concentrações mais elevadas podem ser considerados como um *stress* acrescido para a célula, e consequentemente induzir a via da necrose (Elmore, 2007). Na realidade, muitos autores referem que a grande maioria destes agentes induzem principalmente a apoptose. Além disso, a execução do programa de morte por apoptose requer a manutenção do nível de energia intracelular suficiente, e de um estado de oxidação-redução compatíveis com a ativação de caspases. Assim, a exaustão do ATP e O₂, ou *stress* oxidativo severo, pode induzir a morte celular por necrose, e não por apoptose (Orrenius, 2004).

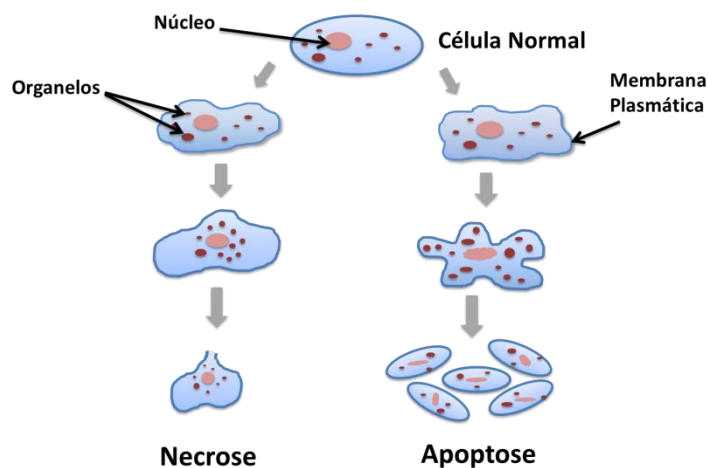


Figura 1.4 - Esquema representativo das alterações morfológicas que ocorrem durante os mecanismos de morte celular: necrose e apoptose (Adaptado de Van der Meer *et al.*, 2010).

1.2.1 Apoptose

O processo de morte celular por apoptose consiste num processo fisiológico com um papel importante na manutenção da homeostasia celular, na progressão do desenvolvimento embrionário e no sistema imunológico. Desta forma, este processo é essencial para a manutenção do desenvolvimento normal dos seres vivos, sendo importante para eliminar células defeituosas ou potencialmente perigosas (Golstein e Kroemer, 2007; Kroemer *et al.*,

2005; Song e Steller, 1999; Choen, 1997). A apoptose é ainda considerada um mecanismo pelo qual alguns agentes quimioterapêuticos exercem a sua atividade anti-tumoral.

A apoptose, ou morte celular programada, consiste num programa de morte intrínseco à célula, isto é, desencadeado geneticamente, como resposta a diversas situações fisiológicas bem como patológicas (Debatin, 2004). Caracteriza-se por uma sucessão de alterações moleculares e bioquímicas que conduzem às diferentes características morfológicas típicas da apoptose (Debatin, 2004; Choen, 1997). O mecanismo apoptótico é iniciado pela condensação da cromatina nuclear (picnose) e contração celular. Posteriormente ocorre a dilatação do retículo endoplasmático, compactação de outros organelos citoplasmáticos, e alterações na membrana plasmática (formação de vesículas membranares) resultando na perda de aderência a células vizinhas. Na fase final, ocorre a fragmentação nuclear, seguida da formação de corpos apoptóticos, os quais são reconhecidos por células fagocitárias, que previnem uma resposta inflamatória (típica da necrose) (Elmore, 2007; Ferreira *et al.*, 2002; Choen, 1997). O mecanismo da apoptose é altamente conservado entre espécies, e envolve uma série de moléculas de sinalização, sendo verificada a ativação de cascatas de caspases considerado como o evento característico da apoptose (Fan *et al.*, 2005; Shi, 2002). O mecanismo de cascatas das caspases desempenha um papel fundamental na indução da transdução e amplificação de sinais intracelulares apoptóticos (Fan *et al.*, 2005). As caspases são uma família de proteases de cisteína com elevada especificidade para substratos de aspartato, e têm como função atuar como os mediadores da apoptose (Fan *et al.*, 2005; Debatin, 2004; Ferreira *et al.*, 2002). O grupo das caspases, que se encontram ativas especificamente nas células em apoptose, é dividido em dois grandes grupos funcionais, as caspases iniciadoras e as caspases efetoras, que englobam respetivamente as caspases -2, -8, -9, -10 e as caspases-3, -6, -7, e são sintetizados como pro-enzimas, sendo que a sua ativação ocorre por clivagem proteolítica (Debatin, 2004; Shi, 2002; Ferreira *et al.*, 2002). As caspases iniciadoras promovem a sua própria ativação (autoativação) através da sua agregação, e uma vez ativas, conduzem à ativação das caspases efetoras, por clivagem em resíduos internos de aspartato, através de uma cascata que amplifica a via de sinalização (Elmore, 2007). As caspases efetoras são responsáveis pela clivagem de vários substratos citoplasmáticos e nucleares, nomeadamente proteínas reguladoras e estruturais conduzindo à inibição de funções celulares básicas por afetarem a estrutura do citoesqueleto e vias de regulação do ciclo celular e sinalização celular (Elmore, 2007; Debatin, 2004).

As duas principais vias apoptóticas constam da via extrínseca ou de recetor de morte celular ou a via intrínseca ou mitocondrial, que se encontram resumidamente descritas nos pontos 1.2.1.1 e 1.2.1.2, respetivamente (Elmore, 2007; Ferreira *et al.*, 2002). Ambas as vias

convergem para a ativação de cascatas de caspases efetoras, sendo esta fase considerada a fase de execução da apoptose (Debatin, 2004). A partir do momento que é iniciada a atividade proteolítica das caspases, a morte celular por apoptose torna-se um processo irreversível (Elmore, 2007).

Um elevado número de agentes anti-tumorais exercem os seus efeitos terapêuticos por indução de apoptose. A indução do processo apoptótico, como um dos mecanismos chave pelo qual compostos citotóxicos eliminam as células tumorais, ocorre principalmente através da ativação da via intrínseca ou mitocondrial da apoptose (Mondal et al., 2012). A sinalização da via extrínseca ou de recetor de morte celular contribui para a sensibilidade das células tumorais aos tratamentos citotóxicos (Tan e Xia, 2009).

1.2.1.1 Via Extrínseca ou de Recetor de Morte Celular

A via extrínseca ou de recetor de morte celular (Figura 1.5) envolve interações mediadas por recetores transmembranares, existindo uma associação entre um ligando específico e o recetor correspondente. Estes recetores são recetores de morte pertencentes principalmente à superfamília TNF (do inglês *Tumor Necrosis Factor*). Os membros da família dos recetores TNF apresentam um domínio citoplasmático com cerca de 80 aminoácidos denominado por domínio de morte que desempenha um papel fundamental na transmissão do sinal de morte a partir da superfície da célula para as vias de sinalização intracelulares. A sequência de eventos que definem a fase extrínseca de apoptose baseia-se nos modelos de ligando e recetor FasL/FasR e TNF- α /TNFR1 e, após a ligação do ligando, são recrutadas proteínas adaptadoras citoplasmáticas com domínios de morte correspondentes que se ligam aos recetores. Posteriormente dá-se a associação destas proteínas à pró-caspase-8 através de dimerização do domínio efetor de morte. Neste ponto, o DISC (do inglês, *Death-Inducing Signaling Complex*) forma-se, o que resulta na ativação da caspase-8. Após a ativação da caspase-8, o processo de execução da apoptose desencadeia-se (Elmore, 2007; Ghobrial *et al.*, 2005; Debatin, 2004). Entre as vias extrínseca e intrínseca pode existir um *crosstalk* promovido pela proteína Bid (do inglês, *BH3 interacting domain death agonist*), pertencente à família de proteínas Bcl-2, com atividade pro-apoptótica. A Bid é ativada após clivagem proteolítica pela caspase-8, ativando desta forma a proteína Bax, que leva por sua vez à amplificação da via intrínseca da apoptose pela ação da via extrínseca (Festjens *et al.*, 2006; Ray *et al.*, 2005).

1.2.1.2 Via Intrínseca ou Mitocondrial

A via intrínseca ou mitocondrial (Figura 1.5) envolve um conjunto de estímulos que atuam diretamente sobre os alvos biológicos no interior da célula. Estes estímulos desencadeiam sinais intracelulares, que podem atuar tanto de forma positiva como negativa. Sinais negativos envolvem a ausência de certos fatores de crescimento, hormonas e citocinas que podem levar à perda da supressão apoptótica, desencadeando, desta forma, a apoptose. Por sua vez, os estímulos que atuam de forma positiva incluem a radiação, toxinas, hipoxia, hipertermia, infecções virais, radicais livres, entre outros (Elmore, 2007; Ghobrial *et al.*, 2005; Debatin, 2004). Todos estes estímulos são direcionados para a mitocôndria, causando alterações na membrana mitocondrial interna (Elmore, 2007). A permeabilidade da membrana mitocondrial externa é da responsabilidade de proteínas da família Bcl-2, principalmente as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e pró-apoptóticas Bax (Chipuk, 2008). A proporção entre os níveis citoplasmáticos destas duas proteínas é indicativa se a célula entra em apoptose por predominância de Bax relativamente a Bcl-2 (Elmore, 2007; Gonzalez *et al.*, 2001). A proteína pró-apoptótica Bax leva à formação do poro MPT (do inglês, *Mitochondrial Permeability Transition*) após ser transportada do citoplasma para a membrana mitocondrial externa e sofrer oligomerização, levando conseqüentemente à perda do potencial de membrana e libertação de proteínas pró-apoptóticas, como citocromo c, Smac/DIABLO (do inglês, Smac - *Second Mitochondria-derived Activator of Caspase*; DIABLO - *Direct IAP binding protein with low pI*) e HtrA2 (do inglês, *HtrA serine peptidase*) para o citoplasma (Debatin, 2004; Ghobrial *et al.*, 2005; Elmore, 2007). O citocromo c liga-se ativamente à proteína Apaf-1 (do inglês, *apoptotic peptidase activating factor 1*), bem como à pró-caspase-9, formando um complexo, o apoptossoma. Esta associação de proteínas conduz à ativação de caspase-9, que uma vez ativa apresenta a capacidade de ativar caspases efetoras para o desenvolvimento da via de execução da apoptose (Elmore, 2007; Ghobrial *et al.*, 2005; Shi, 2005; Debatin, 2004).

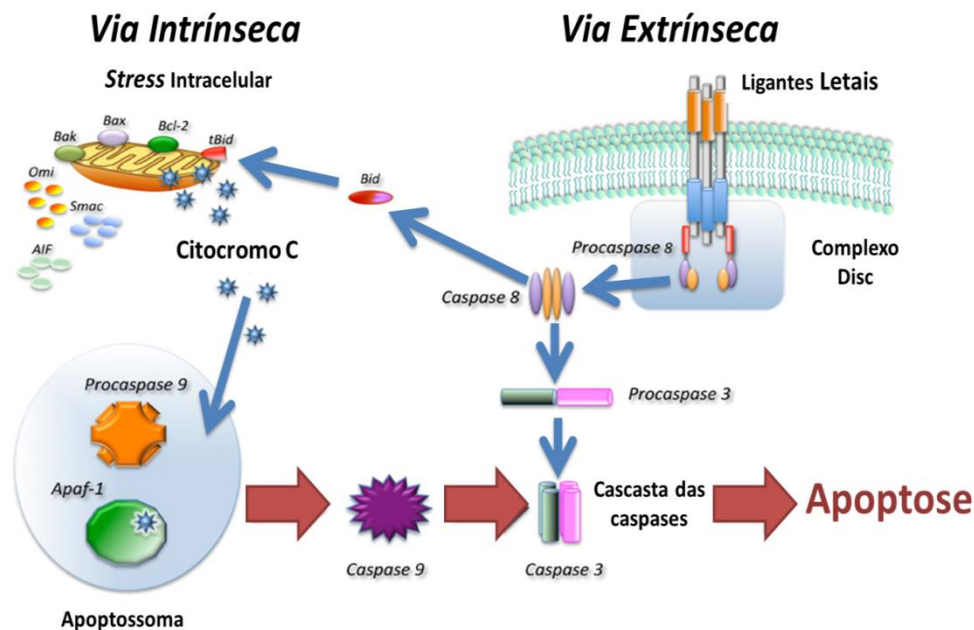


Figura 1.5 - Ilustração representativa das vias intrínseca e extrínseca da apoptose. A via extrínseca depende da ligação entre um recetor de morte celular e o seu ligando e encontra-se associada à via intrínseca através da proteína Bid, que por sua vez despoleta a amplificação desta última via. A via intrínseca, por sua vez, é induzida dependendo da proporção entre a proteína anti-apoptótica Bcl-2 e pro-apoptótica Bax. Ambas as vias progridem até à etapa de execução que é gerida por caspases efetoras, como a caspase 3 (Adaptado de Favalaro *et al.*, 2012).

1.2.1 Gene Supressor de Tumores

O gene supressor tumoral *TP53* é importante na manutenção da estabilidade genética e como tal apresenta-se o gene amplamente mais mutado durante a tumorigénese, sendo constatada a ocorrência de mutações em mais de 50% de todos os cancros humanos (Amaral *et al.*, 2010; Elmore, 2007; Ferreira *et al.*, 2002; Wang, 1997). A proteína supressora de tumores p53 regula o ciclo celular bem como a apoptose, induzindo-a após a ocorrência de danos no DNA (Elmore, 2007; Bartkova, 2005). Assim, a supressão do tumor é severamente reduzida aquando a perda de atividade deste supressor tumoral (Bartkova, 2005).

No processo de tumorigénese a p53 é ativada em resposta a sinais de danos celulares (Salles, 2002). Esta, por sua vez, promove a paragem do ciclo celular no *checkpoint* G1/S através da proteína p21, ativando proteínas de reparação dos danos provocados no DNA, e caso estes danos sejam irreparáveis, pode desencadear a apoptose (Elmore, 2007). Portanto, quando a p53 sofre mutações, as células que apresentam danos no DNA podem desencadear a transformação maligna, uma vez que não é possível a reparação dos danos no DNA por esta via (Elmore, 2007; Salles, 2002).

A atividade supressora tumoral de p53 está principalmente associada com a sua função de fator de transcrição, sendo a apoptose o processo base desta atividade e o qual pode ser desencadeado especialmente pela via mitocondrial, contudo também a via de recetor de morte pode ser desencadeada. Os principais alvos da transativação por p53 consistem na Bax, Puma e Noxa (Amaral *et al.*, 2010).

Outras duas vias pelas quais p53 desencadeia a apoptose e as quais são independentes da atividade transcripcional desta proteína, envolvem uma vez mais a mitocondria, e também o citoplasma, e encontram descritas por Amaral e colaboradores (2010). A primeira depende da translocação de p53 para a mitocôndria com a posterior oligomerização da Bax e assim o desenvolvimento da via mitocondrial. Por sua vez, a via citoplasmática de p53 está dependente da translocação e oligomerização da Bax para a mitocôndria pela ação de p53 (Amaral *et al.*, 2010).

1.3 Ciclo Celular

A divisão celular, a replicação do DNA e o crescimento celular têm que ocorrer de forma coordenada para garantir a formação de novas células. A sequência de eventos pelos quais uma célula duplica o seu genoma, sintetiza os restantes componentes celulares e, finalmente divide-se em duas células-filhas é denominada por ciclo celular (Kastan, 2004). Este processo é dividido em quatro fases sequenciais: G1, S, G2 e M (mitose), como está demonstrado na Figura 1.6 (Garret, 2001). Duas fases cruciais são a fases de replicação do DNA (fase S) e de divisão de uma célula em duas células filhas, e por sua vez a fase M apenas pode ocorrer se a fase S for correta e completamente finalizada (Kastan, 2004; Garret, 2001).

A fase G1 corresponde ao intervalo entre a mitose e o início da replicação do DNA, e é durante esta fase que as células se encontram metabolicamente ativas e crescem continuamente, sem no entanto replicarem o seu conteúdo em DNA (Kastan, 2004). A fase S corresponde ao período durante o qual ocorre a síntese ou replicação do DNA, duplicando-se assim o conteúdo em DNA mas mantendo o mesmo número de cromossomas (Kastan, 2004; Garret, 2001). A fase G2 corresponde ao intervalo imediatamente após a fase S e é nesta fase que a célula se prepara para entrar em mitose (Garret, 2001). A fase M é iniciada com a divisão nuclear, correspondendo à separação dos cromossomas, e termina normalmente com a divisão citoplasmática (citocinese). Nesta fase ocorre ainda a reorganização da maioria dos componentes celulares, uma vez que o número de cromossomas nas células progenitoras e descendentes é o mesmo. A mitose pode ser dividida em quatro estágios de divisão celular: profase, metáfase, anáfase e telófase (Kastan, 2004). Finalmente a fase G0, também conhecida por uma fase de quiescência, na qual a célula pode reversivelmente sair da fase G1 e entrar

nesta fase, em que as células permanecem metabolicamente ativas, mas não proliferam (Kastan, 2004; Garret, 2001).

O controlo ao nível da progressão do ciclo celular baseia-se em mecanismos pelos quais ocorre a paragem do ciclo celular aquando da transição de fases, denominados de *checkpoints*, até que seja possível assegurar que a célula se encontra preparada para prosseguir com o ciclo celular (Kastan, 2004). Um *checkpoint* baseia-se num mecanismo tipo “sensor” que deteta eventos anormais ou incompletos do ciclo celular, tais como danos no DNA, sendo em consequência seguida uma via de transdução de sinal que transmite o sinal do sensor para o efetor o que pode levar à paragem do ciclo celular (Garret, 2001). O primeiro *checkpoint* ocorre na transição da fase G1 para S, o principal *checkpoint* para danos no DNA (Figura 1.6). Também na fase S podem ocorrer danos no DNA durante o processo de replicação o que leva à paragem do ciclo celular, na fase G2 (Figura 1.6). Na regulação do ciclo celular também existe o ponto de restrição, que ocorre entre a fase G1 média e tardia. Este é o ponto que verifica se as células receberam os sinais de crescimento necessários, para que possam progredir da fase G1 para a fase S e, assim efetuar a replicação do DNA. Caso a célula não tenha recebido os sinais apropriados, as células entram na fase G0. Os *checkpoints* do ciclo celular devem ocorrer corretamente, caso contrário a proliferação celular pode ser inadequada como acontece nas células tumorais. Uma vez que todos os tumores humanos apresentam mutações genéticas nos genes que controlam a progressão do ciclo celular (Garret, 2001)

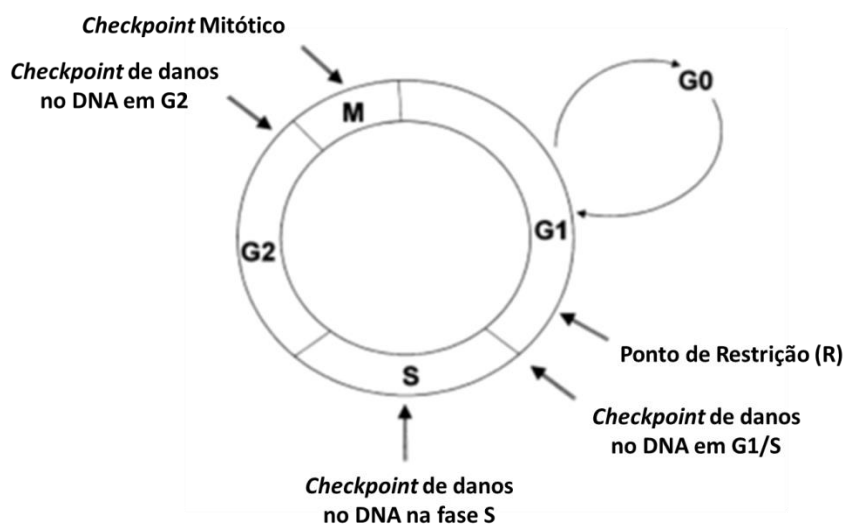


Figura 1.6 - Representação esquemática das fases do ciclo celular e os seus *checkpoints* (Adaptado de Garrett, 2001).

O grupo de moléculas cruciais à progressão do ciclo celular denomina-se de Cdks (do inglês, *cyclin dependent kinases*), pertencentes à família das cinase de serina/treonina, e cuja completa atividade é dependente da sua associação com uma subunidade reguladora designada de ciclina (Figura 1.7). Consoante a fase do ciclo celular diferentes Cdks tornam-se ativas, sendo a sua expressão constante ao longo do ciclo celular, enquanto a expressão de cada ciclina, é dependente da fase do ciclo celular (Figura 1.7) (Garret, 2001; Abraham, 2001). As Cdks controlam a progressão do ciclo, pela sua atividade de fosforilação de proteínas que desempenham funções específicas nas diferentes fases do ciclo celular (Garret, 2001). No início de G1, a pRb (proteína do gene supressor de tumores retinoblastoma) encontra-se num estado não fosforilado, reprimindo a atividade de fatores de transcrição da família E2F, por ligação aos mesmos, a qual é essencial à expressão dos genes necessários para a fase S (Harbour, 2000). A progressão da fase G1 para S, é dependente da fosforilação de pRb, inicialmente promovida pelas cinases Cdk4 e Cdk6, associadas a uma das três subunidades de ciclina D1, D2 e D3 (Garrett, 2001; Harbour, 2000). Posteriormente a expressão da ciclina E, com a formação do complexo de Cdk2/ciclina E, permite a contínua fosforilação de pRb, levando por sua vez à rutura da interação entre o pRb-E2F e desta forma tornando os fatores de transcrição E2F ativos (Kastan, 2004; Abraham, 2001). À medida que as células progridem para a fase S, ocorre a expressão da ciclina A e esta associa-se agora à Cdk2, tendo este complexo novos substratos proteicos da fase S, como é o caso da Cdc6, uma proteína essencial para a prevenção da replicação do DNA. Por sua vez, a progressão de G2 para a mitose requer a atividade da cinase Cdc2 (também definida como Cdk1), que uma vez complexada com a ciclina B, levam à fosforilação de proteínas necessárias à mitose (Garret, 2011; Kastan, 2004).

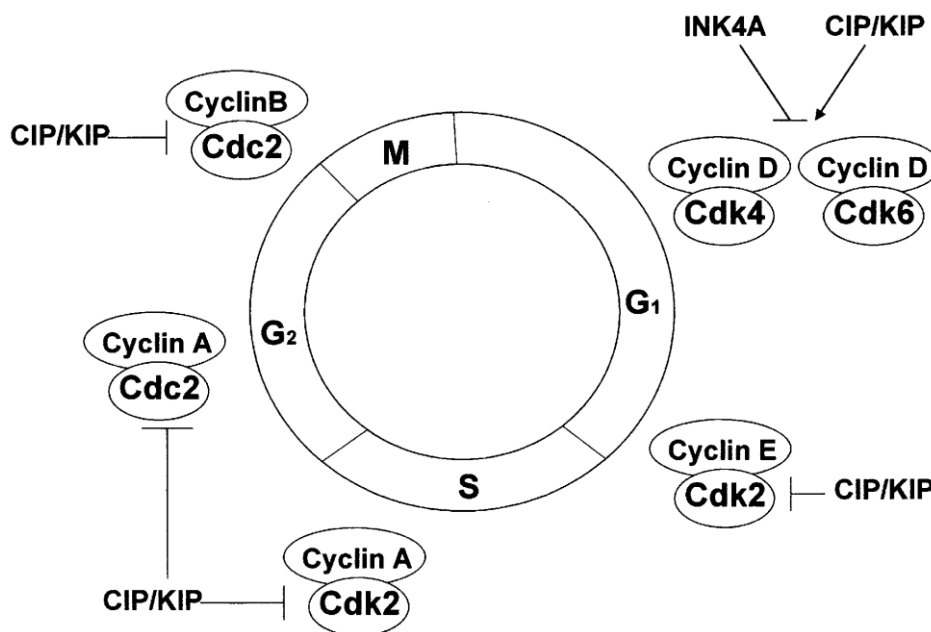


Figura 1.7 - A interação entre Cdk's e as ciclinas envolvidas nas diferentes fases do ciclo celular (Adaptado de Garret, 2001).

Agentes genotóxicos, uma vez induzindo danos no DNA, ativam várias respostas celulares, sendo a resposta primária a paragem do ciclo celular em G₁/S (Kastan, 2004; Abraham, 2001; Garrett, 2001). A paragem do ciclo celular no *checkpoint* G₁/S é dependente do produto do gene supressor de tumores *TP53*. Danos no DNA induzem um aumento do nível de p53, que induz posteriormente a transcrição de genes que promovem paragem do ciclo celular ou a apoptose, incluindo o gene que codifica para p21^{Cip1} (Kastan, 2004; Garret, 2001; Abraham, 2001).

1.4 Linhas Tumorais Humanas em Estudo

1.4.1 Carcinoma Colorectal Humano

O carcinoma colorectal (CCR) é a segunda principal causa de morte por cancro (O'Brien et al., 2007; Sheg et al., 1997). Em 2008, a incidência do CCR a nível mundial foi de 1 235 108 (9,8 %) de novos casos e 609 051 (8,1 %) mortes (Glocoban, 2012). Em geral, o risco do CCR na população é de cerca de 5 a 6 % (Lynch, 2003). Os fatores de risco para neoplasia colorectal incluem o consumo excessivo de carnes vermelhas, o tabagismo e o consumo de álcool, estando ainda associada a história familiar positiva (Potter et al, 1999).

O CCR surge pela ocorrência em simultâneo de ambos os cancros do cólon e reto (Centelles, 2012; Iacopetta, 2002). O processo tumorigénico é iniciado com a formação de um pólio adenomatoso pré-maligno na mucosa colorectal normal, que posteriormente evolui para

um adenoma, e após se tornar displásico progride para um cancro invasivo, o carcinoma (Ricci-Vitiani *et al.*, 2007; Hagggar *et al.*, 2009). Como referido são diversas as alterações a nível genético que desencadeiam o processo de tumorigénese sendo que os mecanismos epigenéticos e a acumulação de mutações genéticas permitem a progressão tumoral por conferirem uma vantagem proliferativa às células cancerígenas (Millan, 2009; Michor *et al.*, 2005). Das alterações que desencadeiam o processo de tumorigénese do CCR designam-se as que ocorrem ao nível da expressão de genes supressores de tumores, como é o caso do gene *APC* (do inglês, *Adenomatous Polyposis coli*), de oncogenes ou através da ocorrência de metilação destes genes (Zhang *et al.*, 2011). A disrupção da via APC apresenta-se de fato como uma das principais alterações genéticas responsáveis pelo desenvolvimento de CCR, representando aproximadamente 95 % dos casos (Michor *et al.*, 2005; Natile *et al.*, 2001).

O CCR pode ocorrer tanto como desordem hereditária assim como esporádica. Cerca de 95 % dos CCR são esporádicos, resultantes de mutações somáticas. Os restantes 5 % dos casos de CCR incluem síndromes hereditárias, tais como a polipose adenomatosa familiar e CCR hereditário não-polipose, história familiar/pessoal de pólipos adenomatosos (Centelles, 2012; Zhang *et al.*, 2009).

A remoção cirúrgica consiste na principal forma de tratamento para o CCR, e apresenta a capacidade de cura caso o tumor seja detetado precocemente. O processo compreende a remoção completa do tumor primário bem como as estruturas localmente comprometidas (Boland *et al.*, 2000). A sobrevivência para pacientes com doença localizada é de 90 % (Wilkes, 2009). A quimioterapia, em regime individual ou combinatória com a radioterapia, é normalmente utilizada em casos de CCR invasivo ou metastático, apresentando uma taxa de sobrevivência de 9 % em doentes com CCR metastático após 5 anos (Wilkes, 2009). O 5-Fluorouracilo (5-FU) é o agente quimioterapêutico de maior aplicação no tratamento do CCR avançado (Carethers, 2008). Os agentes quimioterapêuticos irinotecano e oxaliplatina também apresentam uma ampla utilização no tratamento do CRR (Goldberg *et al.*, 2004). Na última década, estes agentes têm sido amplamente utilizados em combinação com o 5-FU e a leucovorina como tratamento padrão para CCR metastático. Com a introdução deste tipo de tratamento a duração média de sobrevivência de pacientes com CCR mestástico aumentou de 12 meses para cerca de 18 a 21 meses. Adicionalmente, tem sido demonstrado que a oxaliplatina apresenta atividade citotóxica *in vitro* em linhas de carcinoma colorectal com resistência à cisplatina e carboplatina (Goldberg *et al.*, 2004).

1.4.2 Carcinoma Hepatocelular Humano

O carcinoma hepatocelular (CHC) é um dos carcinomas com maior prevalência mundialmente, sendo considerado o quinto de entre os tumores de maior incidência, apresentando uma estimativa anual de cerca de 564 000 novos casos (Fornari *et al.*, 2008; Gramantieri *et al.*, 2007; Thorgeirsson, 2002; Iwata *et al.*, 2000). O desenvolvimento do CHC tem sido associado a vários fatores, desde virais a ambientais. A infecção crônica provocada pelos vírus da hepatite B ou C juntamente ao agente carcinogénico aflatoxina B1 (AFB) parecem ser responsáveis por cerca de 80 % de todos os CHC humanos. É também considerada como fator de risco, a esteato-hepatite não alcoólica, uma síndrome metabólica caracterizada pela acumulação de lípidos nos hepatócitos. Também a cirrose apresenta-se como um dos principais fatores de predisposição ao CHC, com 80 % dos casos de CHCs a desenvolverem-se em pacientes cirróticos (Gramantieri *et al.*, 2007)

O CHC é um tumor epitelial maligno que se desenvolve nos hepatócitos e é, em geral, altamente vascularizado e de rápida progressão (Tanaka *et al.*, 1999). Caracteriza-se pela invasão dos vasos sanguíneos, com frequente metastização dos ossos e pulmões, apresentando desta forma uma resposta reduzida à terapia localizada (Schwartz e Beuter, 2004). Várias alterações genéticas e epigenéticas têm sido identificadas também revelando uma associação com o desenvolvimento da hepato-carcinogénese. Na maioria dos casos de CHC são identificadas alterações nos genes relacionados com o ciclo celular, incluindo os genes que codificam para as proteínas p16, p21, p27, ciclina A, ciclina D1, ciclina E e pRb (Fornari *et al.*, 2008; Iwata *et al.*, 2000).

A difusão de programas de vigilância a pacientes com cirrose hepática teve como consequência o aumento na deteção do CHC, numa fase inicial. No entanto, apesar dos tratamentos oferecerem uma taxa de sobrevivência em 5 anos de 50-70 %, as recorrências após ressecção são superiores a 70 %, o que pode dever-se aos tumores metacrónicos decorrentes de cirrose (Fornari *et al.*, 2008).

O tratamento do CHC depende da estadia de desenvolvimento do tumor, da quantidade de nódulos formados, e do tamanho dos mesmos, do estado do fígado e da existência ou não de metástases (Llovet *et al.*, 2003). Os principais tratamentos são a remoção cirúrgica, o transplante de fígado e os tratamentos percutâneos (Anzola, 2004). A possibilidade de recorrência após remoção cirúrgica, frequentemente devida à ocorrência de metástases, é a maior desvantagem deste tratamento e a principal causa de morte por CHC (Pang *et al.*, 2008). O CHC é pouco sensível aos agentes quimioterapêuticos convencionais, e estes podem ainda apresentar-se como indutores de uma maior toxicidade tendo em conta o comprometimento funcional do fígado associado à cirrose (Fornari *et al.*, 2008). Assim, a baixa eficácia dos

tratamentos disponíveis associada ao grande número de efeitos secundários provocados por exemplo pela doxorrubicina (DOX, o agente quimioterapêutico amplamente usado em casos de CHC avançado), promovem uma mortalidade praticamente em todos os doentes de CHC no período de um ano após o diagnóstico (Manov *et al.* 2011; Tan *et al.* 2009). Estudos recentes baseados na administração combinada de cisplatina, DOX, interferão e 5-Fluorouracilo sugerem o desenvolvimento de uma resposta positiva (Boyle e Levin, 2008).

1.4.3 Adenocarcinoma da Mama

O cancro da mama é o tumor maligno mais comum em mulheres, surgindo anualmente, em média, 1 milhão de novos casos a nível mundial, e é observável um aumento da sua incidência principalmente em mulheres na faixa etária entre os 50 e os 64 anos (Soyocak, 2012; McPherson *et al.*, 2000). Nos Estados Unidos ocorrem mais de 40 mil mortes em cada ano por cancro da mama (Jemal *et al.*, 2010; Lacey *et al.*, 2002). As principais causas que contribuem para a incidência do cancro da mama são: o consumo de álcool, fatores reprodutivos ou hormonais (início precoce da menstruação, nuliparidade ou idade tardia do primeiro parto, curta duração do aleitamento, menopausa tardia, obesidade pós-menopausa, uso prolongado de contraceptivos orais e terapia de reposição de estrogénio prolongada) e a sua deteção tardia (Jemal *et al.*, 2011; Russo *et al.*, 2000). Os genes supressores de tumores *BRCA1* (do inglês, *breast cancer 1, early onset*) e *BRCA2* (do inglês, *breast cancer 2, early onset*) apresentam-se como duas das principais mutações familiares que promovem a incidência do cancro da mama (O'Donovan, 2010).

As indicações clínicas atuais para o tratamento do cancro da mama integram fatores clínicos e patológicos, tais como o tamanho e o estado nodal do tumor (Dubsky *et al.*, 2012). A terapia com tamoxifeno apresenta-se associada à promoção de vários benefícios, como a melhoria no perfil de lípidos e aumento da densidade mineral óssea em mulheres na pós-menopausa, no entanto a mesma conduz a vários efeitos adversos, incluindo trombozes venosas e cancro do endométrio (Jin *et al.*, 2005). Outro tratamento de escolha para as mulheres com sintomas de menopausa é a administração de estrogénio (Quella *et al.*, 2000). No entanto, há estudos que indicam que o estrogénio induz a formação de cancro da mama, pois as células tumorais apresentam recetores ER (do inglês, *estrogen recetor*), que fazem com que esta terapia seja contra-indicada para o cancro da mama (Quella *et al.*, 2000; Russo *et al.*, 2000). A associação da quimioterapia e do tratamento endócrino poderá resultar numa terapêutica mais efetiva contra o cancro da mama (Dubsky *et al.*, 2012). Contudo, apesar dos avanços na deteção bem como no tratamento de metástases, existem ainda muitas limitações

devido à aquisição de resistência por parte das células tumorais, resultando uma elevada taxa de mortalidade por esta doença (Lacey *et al.*, 2002).

1.5 Terapêutica do Cancro

A deteção precoce e precisa assim como a realização de exames de rastreio regulares revelam-se importantes na prevenção e no tratamento do cancro (Feng, 2003). As terapêuticas convencionais para o cancro constam da remoção cirúrgica completa e radioterapia, bem como a quimioterapia, sendo ainda conhecidos outros tratamentos, como imunoterapia, terapia hormonal e terapia-alvo (American Cancer Society, 2012; Boulikas *et al.*, 2007; Feng, 2003; Kovvali, 2002). A cirurgia e a radioterapia apresentam-se como tratamentos locais enquanto a quimioterapia consiste num tratamento sistémico (Kelsen *et al.*, 1998). O procedimento preliminar para a eliminação de tumores suficientemente grandes para manipulação é geralmente a remoção cirúrgica quer do tumor quer do tecido circundante. No entanto, normalmente encontram-se células cancerígenas residuais ou podem ainda estar presentes células metastáticas, que tornam a cirurgia, um procedimento de difícil execução e inefetivo. Desta forma, a remoção cirúrgica apresenta-se como um tratamento eficaz num estadio de desenvolvimento tumoral inicial, e é normalmente aplicada em conjugação com outros procedimentos, tais como a radioterapia, a quimioterapia, a imunoterapia, entre outras. De fato, este tratamento combinatório proporciona uma alternativa à eliminação de células cancerígenas metastáticas ou, pelo menos, à manutenção do seu estado de remissão (Sousa, 2012; Feng, 2003; Beil, 2002; Kelsen *et al.*, 1998). Nos casos em que a remoção cirúrgica não é possível, a radioterapia e a quimioterapia são os tratamentos viáveis (Sousa, 2012; Kelsen *et al.*, 1998). O tipo de tratamento é escolhido consoante o estadio de desenvolvimento do cancro, assim, caso seja detetado precocemente, a cirurgia e a radioterapia são tratamentos normalmente mais eficazes, caso seja detetado em estadios mais avançados, como os de metastização, a quimioterapia apresenta-se o tratamento mais adequado (Sousa, 2012; Chabner, 2005; Matos, 2001).

A quimioterapia tem uma aplicação clínica há mais de 50 anos, apresentando resultados satisfatórios em vários tipos de cancro, e entende-se pela aplicação de agentes químicos que afetem o funcionamento celular, promovendo a morte seletiva de células cancerígenas ou a inibição da capacidade proliferativa das mesmas (Feng *et al.*, 2007; Kostova, 2006; Longley, 2005; Feng e Chien, 2003). Apesar da eficácia da quimioterapia, este tratamento apresenta grandes problemas devido à toxicidade dos agentes quimioterapêuticos em tecidos saudáveis assim como a capacidade das células tumorais apresentarem ou adquirirem resistência

(Bharali, 2010; Feng et al., 2007). Em geral, os agentes quimioterapêuticos apresentam uma atividade preferencial para células cancerígenas devido à rápida proliferação destas comparativamente às células normais (Feng e Chien, 2003). Os agentes mais eficazes em quimioterapia apresentam como alvo a replicação do DNA ou o metabolismo celular. Contudo, devido à capacidade destes agentes em atuar sobre células de rápida proliferação verifica-se que estes atuam também em células normais de rápida proliferação, como as células da medula óssea e os enterócitos (Johnstone *et al.*, 2002). Desta forma, os agentes quimioterapêuticos devem apresentar elevada especificidade para as células tumorais, com o intuito de promover efeitos citotóxicos ou citostáticos apenas nestas e não afetarem significativamente as células saudáveis, evitando desta forma os problemas de toxicidade (Bharali, 2010; Feng *et al.*, 2007).

1.6 Agentes quimioterapêuticos

1.6.1 A Cisplatina

A cisplatina (*cis*-diaminodicloro-platina(II)) (Figura 1.8), consiste no primeiro complexo de platina a ser aplicado na terapêutica do cancro, dada a sua notória eficácia na inibição da divisão de células de *Escherichia coli* como demonstrado por Rosenberg em 1965 (Kelland, 2007; Kostova 2006; Desoize 2004; Desoize e Madoulet, 2002; Rosenberg *et al.*, 1965). Este complexo é caracterizado como uma molécula alquilante bifuncional, uma vez que cada molécula de cisplatina apresenta a capacidade de estabelecer duas ligações covalentes com o DNA, resultando na formação de adutos no DNA, através dos quais a cisplatina promove a sua atividade anti-tumoral (Helleday *et al.*, 2008; Kelland, 2007). A descoberta da aplicação terapêutica da cisplatina teve um grande impacto clínico no tratamento de vários cancros humanos, nomeadamente no cancro dos ovários e dos testículos, e ainda em outros como o cancro cervical, da bexiga, cabeça e pescoço (Lin *et al.* 2011; Marzano et al., 2009; Gabano *et al.* 2008; Hannon, 2007; Kostova 2006; Schweyer *et al.* 2004; Fuertes *et al.* 2003). Este agente é aplicado clinicamente em cerca de 50 a 70 % dos pacientes com cancro, em combinação com outros agentes quimioterapêuticos (Dyson, 2006; Kostova, 2006).

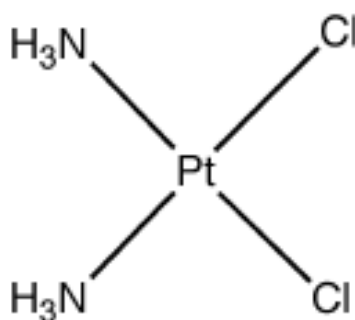


Figura 1.8 - Ilustração da estrutura do complexo *cis*-diaminodicloro-platina (II), cisplatina (Hannon 2007).

O tratamento com a cisplatina é limitado uma vez que esta molécula promove o aparecimento de vários efeitos tóxicos em células de tecidos saudáveis, nomeadamente nefrotoxicidade, neurotoxicidade e ototoxicidade, fraqueza, náuseas e vômitos, e por vezes anemia grave, como resultado do tratamento com concentrações elevadas e períodos prolongados de cisplatina (Bouchal *et al.*, 2011; Marzano *et al.*, 2009; Wong, 1999; Natile, 2001; Kostova, 2006; Boulikas *et al.*, 2007; Hannon, 2007). Este fato deve-se grandemente à reduzida seletividade deste complexo para as células tumorais (Hannon, 2007). Associado aos problemas de toxicidade, ocorre também o desenvolvimento de resistência por parte de células tumorais à cisplatina, quer seja resistência adquirida ou intrínseca (Kelland, 2007). A resistência pode ser adquirida após diversos ciclos de tratamento com cisplatina, como ocorre em pacientes com, por exemplo cancro dos ovários. Por sua vez, a resistência intrínseca, é observada em pacientes com, por exemplo, cancro colorectal, da próstata, do pulmão ou da mama (Kelland, 2007).

Assim, a descoberta da atividade anti-tumoral da cisplatina juntamente ao conhecimento das desvantagens após aplicação terapêutica da cisplatina, proporcionou um súbito e crescente interesse para o estudo e síntese de novos complexos metálicos como agentes anti-tumorais com melhoradas propriedades farmacológicas (Alama *et al.*, 2009; Marzano *et al.*, 2009; Zhang, 2003).

Os principais objetivos do desenvolvimento de novos complexos consistem em aumentar a especificidade para as células tumorais, reduzindo assim os efeitos citotóxicos e citostáticos em células saudáveis, ultrapassar os mecanismos de resistência, mantendo, no entanto, a grande citotoxicidade associada à cisplatina (Hannon, 2007).

Os complexos metálicos ao serem carregados positivamente, apresentam a capacidade de se ligar a biomoléculas carregadas negativamente, como sendo os constituintes das

proteínas e dos ácidos nucleicos, o que faz destes, excelentes ligandos para os iões metálicos (Zhang, 2003).

O DNA tem sido o principal alvo biológico para agentes quimioterapêuticos (Neidle, 2001). Existem três tipos principais de interações reversíveis que podem ocorrer entre os complexos metálicos e o DNA (Hadjilaidis e Sletter, 2009). O primeiro tipo de interações envolve a formação de ligações covalentes entre os ácidos de Lewis do metal e as bases de Lewis do ácido nucleico, como os resíduos N7 da guanina (ligação preferencial para a cisplatina) (Reedijk, 1985). O segundo tipo ocorre através de interações do complexo metálico com os sulcos do DNA, e o terceiro tipo consiste numa interação electrostática estabelecida entre um complexo catiónico e o esqueleto açúcar-fosfato do DNA, que pode provocar modificações na estrutura do DNA e desencadear a apoptose (Hadjilaidis e Sletter, 2009).

Os complexos organometálicos podem funcionar como agentes intercalantes, intercalando com o DNA consoante a presença de estruturas aromáticas planares capazes de originar um emparelhamento π - π com as bases azotadas. Desta forma, os ligandos têm a capacidade de posicionar-se entre dois pares de bases adjacentes, o que provoca um desenrolamento local da hélice dupla do DNA e consequentemente uma distorção da mesma. A quebra direta do DNA de cadeia dupla, é detetada pela proteína p53, a qual pode, em seguida, ativar as vias apoptóticas (Neidle, 2001). Desta forma, existe uma grande variedade de complexos metálicos que apresentam como átomos metálicos centrais o titânio, o gálio, o germânio, o paládio, o ouro, o cobalto, o ruténio e o estanho, que estão a ser intensivamente estudados como possíveis substituintes da cisplatina. Além disso, os compostos de cobre (II) parecem ser candidatos promissores para a terapia anti-tumoral (Hannon, 2007).

1.6.2 Doxorubicina

A doxorubicina (DOX) (Figura 1.9), isolada pela primeira vez a partir de *Streptomyces peucetius* em 1960, pertence à família das antraciclinas, e apresenta-se como um agente anti-tumoral de ampla aplicação na terapêutica do cancro (Lee *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2013; Aghaee *et al.*, 2013; Swain *et al.*, 2003). Este composto é um dos agentes quimioterapêuticos com maior eficácia no tratamento de vários tipos de cancro, incluindo o linfoma, a leucemia e tumores sólidos (Chen *et al.*, 2013; American Cancer Society, 2011; Swift *et al.*, 2006). É também geralmente aplicado em regime combinado com outros agentes em linfoma não-Hodgkin's, leucemias agudas, mieloma múltiplo, cancros da mama, pulmão, ovários e outros (American Cancer Society, 2011; Swift *et al.*, 2006).

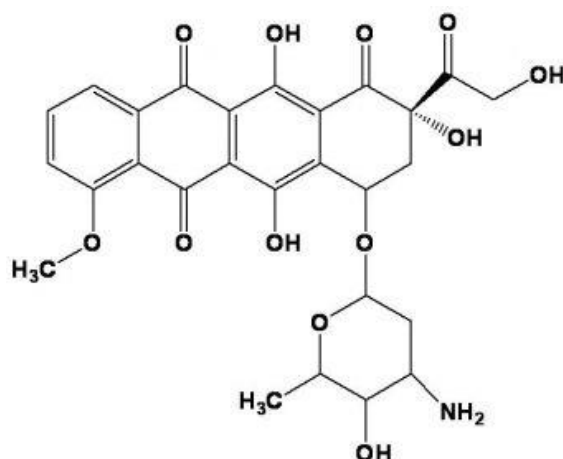


Figura 1.9 - Estrutura molecular da doxorubicina (Stiborova *et al.*, 2012).

A atividade citotóxica da DOX advém principalmente da sua capacidade em estabelecer ligação e estabilização do complexo de clivagem DNA-topoisomerase II α , que por sua vez resulta na inibição da função normal da enzima. Desta forma, o complexo é incapaz de religar as quebras produzidas na molécula de DNA e, conseqüente ocorre a indução do processo apoptótico (Aghaee *et al.*, 2013). Existe também a indicação de outros mecanismos envolvidos na atividade anti-tumoral da DOX, nomeadamente a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), os quais provocam danos mitocondriais e induzem igualmente a apoptose (Koti *et al.*, 2013).

Embora a DOX apresente grande eficácia anti-tumoral, algumas restrições foram impostas na sua aplicação clínica, nomeadamente a aquisição de resistência das células tumorais a este composto e a toxicidade em tecidos saudáveis, principalmente devido à sua toxicidade cardíaca aguda e crónica, o que provoca miocardiopatia crónica e insuficiência cardíaca congestiva (Lee *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2013; Aghaee *et al.*, 2013; Swain *et al.*, 2003). A DOX apresenta ainda efeitos colaterais comuns como a diminuição do número de células no sangue, perda de apetite, estomatite, alopecia (perda de cabelo), náuseas e vômitos, toxicidade do fígado e arritmia aguda (Aghaee *et al.*, 2013).

1.6.3 Compostos de Cobre

O cobre (Cu) está presente em todos os organismos vivos como um elemento essencial na química redox, no crescimento e desenvolvimento celular (Marzano *et al.*, 2009). Este elemento desempenha importantes papéis na funcionalidade de diversas proteínas e enzimas envolvidas no metabolismo de energia, respiração celular e síntese de DNA (Iakovidis, 2011; Marzano *et al.*, 2009).

Os mecanismos homeostáticos de Cu desempenham um papel importante na prevenção da toxicidade deste elemento. A exposição a níveis excessivos de Cu pode por seu lado resultar na promoção de vários efeitos adversos, como sendo danos no fígado e nos rins, anemia e imunotoxicidade (Iakovidis, 2011). O Cu na forma de iões bivalentes (Cu(II)) é muito tóxico para os organismos inferiores, como por exemplo, bactérias e outros microrganismos. Analogamente, em humanos, quando presente em concentrações elevadas, pode tornar-se tóxico para as células. De fato, níveis elevados de Cu têm sido encontrados em vários tipos de cancros humanos, como é o caso dos cancros da prostata, mama, cólon, pulmão e cérebro (Marzano *et al.*, 2009).

A toxicidade do Cu provém da sua atividade principal de produção de ROS, como resultado da reação direta com o oxigénio molecular, promovendo desta forma dano oxidativo nas membranas ou macromoléculas, mas também da capacidade em clivar diretamente a molécula de DNA e RNA (Iakovidis, 2011; Marzano *et al.*, 2009). A ligação de iões de Cu a locais específicos, pode levar à modificação da conformação de proteínas, do DNA, assim como de biomembranas. Este tipo de ligação é dependente do tamanho e carga deste elemento, da sua afinidade electrónica e da geometria adotada pelo aducto formado. O Cu apresenta elevada afinidade para a molécula de DNA comparativamente a outro catião bivalente, promovendo, assim, a oxidação desta molécula (Marzano *et al.*, 2009). Assim, a procura e o estudo de novos agentes com potenciais propriedades anti-tumorais são direcionados para complexos biologicamente ativos formados por iões essenciais, como é caso do Cu (Iakovidis, 2011; Morzano *et al.*, 2009).

Existe pouca informação sobre os mecanismos de ação dos complexos metálicos não-platinados, contudo está claro que os iões metálicos podem atuar de variadas formas diferentes relativamente à dos compostos de platina. Estes complexos não-platinados apresentam ainda diferente biodistribuição e toxicidade relativamente aos compostos de platina o que leva a que estes complexos sejam eficazes contra tumores humanos que possam apresentar resistência a complexos de platina convencionais. E uma vez sendo o Cu, um elemento essencial este apresenta-se menos tóxicos do que os metais não-essenciais, como a platina. Isto despertou a que nos últimos anos várias famílias de compostos de Cu tenham sido estudados como potenciais agentes anti-tumorais (Marzano *et al.*, 2009).

1.7 Introdução ao Tema da Tese

Este estudo tem por base o conhecimento de que compostos de Cu apresentam-se como potenciais agentes anti-tumorais, tendo por base diferentes mecanismos de ação e toxicidade em células tumorais relativamente a compostos platinados, que são conhecidos

pela sua grande aplicação em quimioterapia, considerando assim os compostos de Cu como uma melhorada abordagem terapêutica (Iakovidis, 2011; Marzano *et al.*, 2009)

O objetivo principal desta dissertação consiste na determinação dos mecanismos e alvos biológicos subjacentes à ação de um composto de Cu, denominado de ZM-II (Figura 1.10). Para tal, numa primeira fase procedeu-se à realização de ensaios de viabilidade celular em linhas celulares tumorais e não-tumorais para a avaliação da citotoxicidade deste composto em linhas tumorais e não-tumorais. Subsequentemente, caracterizou-se o mecanismo de indução de morte celular subjacente à sua atividade antiproliferativa. Foi ainda avaliada a capacidade deste composto interagir com o DNA, elucidando o tipo de interação e o seu efeito genotóxico.

Este projeto apresenta também como objetivo a identificação de genes alvo deste composto por comparação do proteoma de linhas tumorais expostas ou não há presença do composto. Apresentado particular interesse em proteínas envolvidas na resposta a *stress* oxidativo, apoptose e sinalização celular.

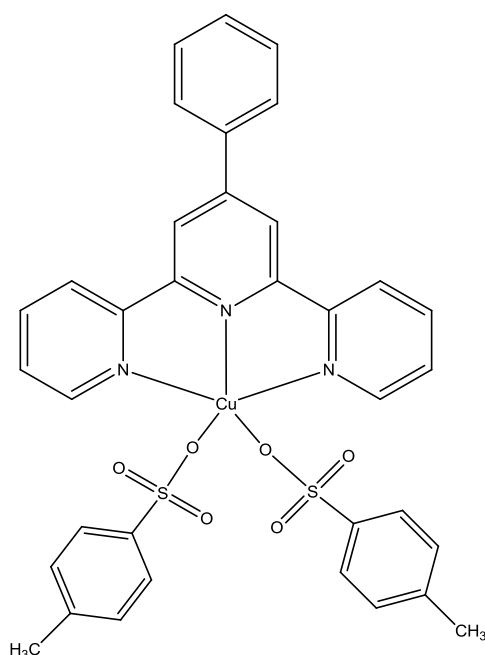


Figura 1.10 - Estrutura molecular do composto de cobre [Cu (4-metilbenzenosulfonato)₂ (4'-fenil-2,2':6',2''-terpiridina)], (ZM-II).

2. Materiais e Métodos

2.1 Composto em estudo

O composto de cobre [Cu (4-metilbenzenosulfonato)₂ (4'-fenil-2,2':6',2''-terpiridina)] (referido como ZM-II) foi sintetizado no Centro de Química Estrutural do Instituto Superior Técnico. O composto é constituído por dois ligandos de 4-metilbenzenosulfonato e um de 4'-fenil-2,2':6',2''-terpiridina e o seu metal de coordenação é o átomo de Cu. Foi preparada uma solução *stock* de 88,2 mM em DMSO, posteriormente aliquotada e mantida à temperatura ambiente. A sua estrutura bem como informação adicional referente à fórmula química, peso molecular e o seu solvente encontram-se representados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Nome, fórmula química, estrutura, peso molecular e solvente do composto em estudo.

Composto	Fórmula Química	Estrutura	Peso Molecular (g/mol)	Solvente
(ZM-II)	C ₃₃ H ₂₉ O ₆ N ₃ S ₂		756,3	DMSO

2.2 Estudo em Linhas Celulares Humanas

Neste trabalho experimental utilizaram-se três linhas celulares tumorais humanas, HCT116 (linha celular de carcinoma coloretal), HepG2 (linha celular de carcinoma hepatocelular) e MCF-7 (linha celular de cancro da mama), cedidas pela Professora Doutora Cecília Rodrigues do Research Institute for Medicine and Pharmaceutical Sciences (iMed), Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

A linha celular tumoral HCT116 é proveniente do colon de um homem já adulto com carcinoma coloretal, e é constituído por células epiteliais aderentes. A linha celular tumoral HepG2 provém do fígado de um adolescente de 15 anos do sexo masculino com carcinoma hepatocelular diferenciado, sendo também constituída por células epiteliais aderentes. A linha

celular tumoral MCF-7 foi isolada a partir de uma glândula mamária de uma mulher de 69 anos com adenocarcinoma e, é constituída, igualmente, por células epiteliais aderentes (

Com o intuito de avaliar a toxicidade do composto em estudo em células não-tumorais, recorreu-se à utilização de duas linhas celulares: a linha celular epitelial mamária MCF-10A, cedida pelo Professor Doutor António Sebastião Rodrigues do Departamento de Genética do Centro de Investigação em Genética Molecular e Humana (CIGMH), Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, e uma cultura celular primária de fibroblastos, cedida pela Professora Doutora Isabel Carreira do Laboratório de Genética Molecular de Cardiopatias e Neurociências, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

A linha celular não-tumoral MCF-10A foi obtida a partir da glândula mamária de uma mulher de 36 anos que apresentava doença fibrocística e é constituída por células epiteliais aderentes. A linha celular de fibroblastos, também estes aderentes, provém da propagação de uma cultura primária derivada de tecido neonatal.

2.2.1 Cultura das Linhas Celulares Humanas

As linhas celulares tumorais humanas HCT116, HepG2 e MCF-7 e a linha celular não-tumoral de fibroblastos foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Invitrogen, New York, EUA) suplementado com 10 % (v/v) de Soro Fetal Bovino (FBS; Invitrogen) e 1 % (v/v) de antibiótico/antimicótico Penicilina-Estreptomicina (*Pen-Step+Antimycotic*; Invitrogen), denominado assim de meio de cultura completo, em frascos de cultura BD Falcon de 75 cm² (BD Biosciences, New Jersey, EUA). Para a linha celular tumoral HepG2 adicionou-se ao meio de cultura completo, 1 % (v/v) de aminoácidos *MEM Non Essential Amino Acids* 100x (Invitrogen). A linha celular não-tumoral MCF-10A foi cultivada em meio de cultura DMEM/F12 (Invitrogen) suplementado com 0,5 mg/mL de hidrocortisona (1 mg/mL) (Sigma, Missouri, EUA), 5 % (v/v) de soro de cavalo (Sigma) e 20 ng/mL de EGF (100 µg/mL) (Sigma), ao qual foram posteriormente adicionados 100 ng/mL de toxina colérica (1 mg/mL) (Sigma) e 10 µg/mL de insulina (10 mg/mL) (Sigma). Os frascos de cultura foram seguidamente incubados a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, numa estufa de CO₂ (Leec, Nottingham, Reino Unido).

2.2.2 Manutenção das Linhas Celulares Humanas

A renovação semanal das culturas foi realizada ao ser atingida uma confluência de aproximadamente 80 %, sendo esta determinada por observação ao microscópio ótico invertido *Olympus CXX41* (Olympus, Tóquio, Japão). Assim, foi aspirado todo o meio de cultura

e foram adicionados 5 mL de tripsina (Invitrogen), incubando posteriormente o frasco de cultura a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa por 5 minutos (min), até as células perderem a aderência à base do frasco. Seguidamente adicionaram-se 5 mL de meio de cultura completo para neutralizar a ação da tripsina e transferiu-se o volume total para tubos BD Falcon de 50 mL (BD Biosciences), centrifugando-os a 1500 rotações por minuto (rpm) durante 5 min numa centrífuga (Hettich EBA21, Tuttlingen, Alemanha) com eliminação posterior do sobrenadante. De seguida, ressuspendeu-se o sedimento celular em 2 mL de meio completo. Num novo frasco de cultura de 75 cm² colocaram-se 15 mL de meio de cultura completo fresco e adequado a cada cultura celular, adicionou-se os 50 µL de suspensão celular e incubou-se a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa.

2.3 Avaliação do Potencial Citotóxico

2.3.1 Ensaio de Viabilidade Celular

A avaliação da citotoxicidade induzida pelo composto ZM-II foi efetuada para as linhas celulares tumorais HCT116, HepG2 e MCF-7 bem como para as linhas celulares não-tumorais de fibroblastos e MCF-10A.

Para os ensaios de viabilidade utilizou-se uma densidade celular de 0,75×10⁵ células/mL. Para tal, determinou-se a densidade celular através da contagem de células viáveis, pelo método de exclusão por azul de *Trypan*, um corante que apenas penetra nas células com a membrana plasmática danificada, permitindo distinguir as células viáveis, que não o incorporam, das células não viáveis que se encontram coradas de azul. A contagem celular foi efetuada recorrendo ao uso de um hemocitómetro (Hirschmann, Eberstadt, Alemanha) e de uma solução contendo 50 µL de suspensão celular (obtida no ponto 2.2.2), 100 µL de azul de *Trypan* a 0,4% (v/v) (Sigma) e 350 µL de meio completo, posteriormente visível ao microscópio ótico. A densidade celular foi então determinada a partir da equação (1), em que *fd* corresponde ao fator de diluição utilizado:

$$(1) \quad \frac{N^{\circ} \text{ Células}}{\text{mL}} = \frac{\Sigma N^{\circ} \text{ Células nos 4 quadrantes}}{4} \cdot 10^4 (\text{volume câmara em mm}^3) \cdot fd$$

Após determinado o volume necessário para preparar uma solução com 0,75×10⁵ células/mL, distribuíram-se 100 µL em cada poço de uma placa de 96 poços de fundo plano (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Bélgica), e incubou-se a placa a 37°C, 5% (v/v) CO₂ e 99 % de humidade relativa durante 24 horas (h) a fim de as células aderirem ao fundo do frasco. Observou-se a placa ao microscópio invertido para avaliar o aspeto das células e a confluência,

que deverá ser aproximadamente 80 %. Prepararam-se, então, soluções do composto ZM-II a várias concentrações, desde 0,025 a 500 µM para HCT116, HepG2 e MCF-7, 0,025 a 100 µM MCF-10A e 0,01 a 10 µM para a linha celular de fibroblastos, por diluição da solução *stock* em meio de cultura. Os controlos foram preparados por adição de DMSO a 0,1 % (v/v) (Sulfóxido de dimetilo; Sigma). Aspirou-se o meio de cultura de cada poço da placa e adicionaram-se 100 µL de cada uma das soluções preparadas anteriormente, incubando-se a placa a 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ e 99 % de humidade relativa durante 48 h. Para avaliação da viabilidade celular foi utilizado o Kit, CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Fitchburg, EUA), segundo as instruções do fabricante. No fim do período de exposição ao composto, aspirou-se o meio e adicionaram-se, a cada poço, 100 µL de uma solução de MTS ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) / PMS (metossulfato de fenazina), na proporção de 100 µL (meio de cultura completo) : 20 µL MTS : 1 µL PMS. A placa foi incubada a 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ e 99 % de humidade relativa durante 30 min e leu-se a absorvância a 490 nm num leitor de microplacas *Multiskan FC Microplate Photometer* (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA).

A conversão do MTS na sua forma aquosa solúvel (formazano) ocorre na presença de desidrogenases mitocondriais, que se encontram presentes em células metabolicamente ativas. Assim, a quantidade de formazano produzido nesta reação é diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes em cultura.

A viabilidade celular (%) foi determinada através da aplicação da equação (2):

$$(2) \quad \text{Viabilidade celular (\%)} = [(\text{Abs}_{490\text{nm}} (\text{composto}) / \text{Abs}_{490\text{nm}} (\text{controlo})) * 100]$$

O ensaio foi efetuado em triplicado para cada concentração de composto. O valor de IC₅₀ (do inglês, *Inhibitory Concentration*) relativo foi determinado recorrendo ao programa *GraphPad* (GraphPad Software Inc., CA, EUA).

2.4 Avaliação do Potencial Apoptótico

2.4.1 Análise por microscopia de fluorescência de células marcadas com Hoechst 33258

A avaliação da capacidade do composto ZM-II induzir a apoptose foi realizada em células de ambas as linhas celulares tumorais HCT116 e HepG2 recorrendo a microscopia de fluorescência através da marcação com a sonda *Hoechst 33258*. A sonda *Hoechst 33258* possui grande afinidade para os ácidos nucleicos e, quando ligada ao DNA emite fluorescência

(comprimentos de onda de excitação e emissão de 352 e 461 nm, respetivamente), o que por sua vez, permite que seja possível detetar alterações na morfologia nuclear (condensação da cromatina e/ou de fragmentação) em células marcadas com esta sonda através da análise por microscopia de fluorescência (Cao *et al.*, 2011; Hoechst Stains, MP21486, Invitrogen, 2005). Prepararam-se culturas das linhas tumorais HCT116 e HepG2 com uma densidade celular final de 1×10^5 células/mL em placas de 35 mm (Orange Scientific). De seguida, incubaram-se as placas a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa por 24 h. Após este período, aspirou-se o meio de cultura e as células foram expostas a 2 mL de cada solução do composto a concentrações crescentes (de 0,025 a 0,1 µM preparadas por diluição da solução *stock* em meio de cultura completo) ou de uma solução de DMSO a 0,1 % (v/v) (controlo) e, incubaram-se a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, durante 48 h. De seguida, aspirou-se o meio e lavaram-se as células três vezes com 1 mL de Tampão Fosfato Salino 1x (PBS 1x, Invitrogen). As células foram fixadas ao ser adicionado 1 mL de uma solução fria de paraformaldeído a 4 % (v/v) em PBS 1x e através da incubação das placas durante 10 min à temperatura ambiente na ausência de luz. Lavaram-se novamente as células três vezes com 1 mL de PBS 1x. Em seguida, adicionou-se a cada placa 1 mL de solução de *Hoechst 33258* (Sigma) (2 µL de *Hoechst 33258* a 5 mg/mL em 1 mL de PBS 1x) e incubaram-se as placas, à temperatura ambiente na ausência de luz durante 15 min. Lavaram-se as células três vezes com PBS 1X e adicionaram-se 20 µL de uma solução de glicerol em PBS 1x na proporção 1:3 (v/v) no centro de cada placa e, cuidadosamente colocou-se uma lamela por cima. Por fim, as células foram observadas ao microscópio de fluorescência Olympus BX51 (Olympus) e fotografadas com a máquina fotográfica Olympus DP50 (Olympus) acoplada ao microscópio, sendo as imagens adquiridas com o *software AnalySIS Soft Imaging System* (Olympus). O ensaio foi realizado em triplicado.

2.4.2 Marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio (IP)

Com o intuito de confirmar a indução da apoptose pelo composto ZM-II e conseguir diferenciar células em apoptose inicial de células em apoptose tardia e, ainda de células necróticas, foi efetuada a dupla marcação com Anexina V-FITC e IP (Brumatti *et al.*, 2008).

Neste ensaio foi utilizado o *Annexin-V FITC Apoptosis Kit* (Invitrogen), que utiliza anexina-V marcada com fluoresceína (anexina-V FITC) em conjunto com o iodeto de propídio para detetar células em apoptose. A proteína anexina-V apresenta grande afinidade de ligação à fosfatidilserina, um fosfolípido membranar que é externalizado para o folheto externo da membrana celular durante a apoptose. Por outro lado, o IP penetra na célula e liga-se ao DNA

sempre que existe perda de integridade membranar, processo associado a necrose ou a apoptose tardia (Cao *et al.*, 2011; Invitrogen, 2010; Brumatti *et al.*, 2008).

O ensaio de marcação com Anexina V-FITC e IP foi realizado no Laboratório de Imunologia, da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, com base num protocolo previamente estabelecido com a Professora Doutora Paula Videira.

Neste ensaio foi utilizada a linha celular tumoral HCT116. Prepararam-se culturas das células desta linha em frascos de cultura de 25 cm², com uma densidade celular de 0,75x10⁵ células/mL e incubaram-se a 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ e 99 % de humidade relativa, durante 24 h. Após a remoção do meio de cultura antigo, as células foram expostas a concentrações de 0,05 e 0,1 µM do composto ZM-II (diluições da solução *stock* em meio de cultura completo) ou a 0,1 % (v/v) de DMSO (controlo) e, posteriormente incubadas a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, durante 48 h. Seguidamente aspirou-se o meio dos frascos de cultura e adicionaram-se 1,5 mL de tripsina, incubando por 5 min a 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ a 99% de humidade relativa. O volume total foi transferido para tubos BD Falcon de 50 mL e centrifugado a 1500 rpm durante 5 min a 25 °C, eliminando-se em seguida o sobrenadante. Posteriormente lavaram-se as células com 2 mL de PBS 1x e centrifugou-se novamente a 1500 rpm durante 5 min a 25 °C, eliminando-se os sobrenadantes. Para a marcação das células com a anexina V-FITC e IP foi usado o Kit *Annexin-V FITC Apoptosis* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Assim, ressuspenderam-se os sedimentos obtidos em 100 µL de tampão de ligação da Anexina V 1x e, de seguida, adicionaram-se 5 µL de Anexina-V conjugada com FITC e 10 µL de IP e incubou-se durante 15 min à temperatura ambiente na ausência de luz. No final deste período, o volume nos tubos de centrífuga foi transferido para novos tubos, aos quais foram adicionados 400 µL de tampão de ligação da Anexina-V 1x. As amostras foram analisadas no citómetro de fluxo *Attune® Cytometric software* (Life Technologies), através da aquisição de 10000 eventos por cada amostra. Os ensaios foram realizados em triplicado.

2.5 Análise da expressão de genes envolvidos na apoptose

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real (qPCR) tem mostrado ser um método eficaz na quantificação da expressão de genes (Livak e Schmittgen, 2001).

Deste modo, para a análise da ação do composto em estudo sobre a expressão de genes envolvidos no processo apoptótico, recorreu-se à técnica de qPCR analisando-se a expressão dos genes *BAX*, *BCL2* e *CASP3* que codificam as proteínas Bax, Bcl-2 e caspase-3, respetivamente.

Utilizou-se a linha celular tumoral HCT116, preparando-se frascos de cultura de 25 cm² com uma densidade celular final de 1×10^5 células/mL, que foram posteriormente incubadas a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, durante 24 h. As células foram seguidamente expostas a 0,05 µM do composto ZM-II (diluição da solução *stock* em meio de cultura completo) ou a 0,1 % (v/v) de DMSO (controlo) e, incubaram-se a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, por 3, 6, 9 e 12 h.

2.5.1 Extração do RNA Total

Após a incubação nas condições referidas, as células foram colhidas ao transferir-se o meio existente nos frascos de cultura para um tubo BD Falcon de 50 mL e pela adição de 1,5 mL de tripsina a cada frasco de cultura e incubação a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, durante 5 minutos, com posterior centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos, ressuspensando-se o sedimento em 1 mL de PBS 1x gelado para lavagem das células. Centrifugou-se novamente a 2500 rpm durante 5 minutos e eliminou-se o sobrenadante.

Para a extração do RNA total utilizou-se o *Kit SV Total RNA Isolation System* (Promega), seguindo o procedimento descrito pelo fabricante. De seguida, as amostras de RNA foram quantificadas no *NanoDrop2000* (Thermo Scientific), por espectrofotometria a 260 nm. O grau de pureza do RNA foi ainda avaliado no *NanoDrop*, com base nas razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} . A primeira razão permite avaliar as quantidades relativas de proteínas que podem estar a contaminar a amostra (valor inferior a 1,8) e o resultado deve ser de cerca de 2 para amostras puras de RNA. Já a razão A_{260}/A_{230} deve estar entre 2,0 e 2,2, uma vez que valores inferiores indicam a existência de contaminantes que absorvem a 230 nm (*SV Total RNA Isolation System Kit*, TM048, Promega 2009). As amostras de RNA total foram armazenadas a -80 °C até utilização.

2.5.2 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA a partir do RNA total foi realizada utilizando o *Kit cDNA Synthesis* (Bioline, Londres, Reino Unido), de acordo com o procedimento descrito pelo fabricante, baseado a reação da enzima transcriptase reversa. Posteriormente, determinou-se a concentração das amostras de cDNA por espectrofotometria a 260 nm, no *NanoDrop*. O grau de pureza do cDNA foi igualmente avaliado no *NanoDrop*, com base nas razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} . As amostras de cDNA foram de seguida armazenadas a 4 °C até à sua posterior utilização.

2.5.3 Amplificação de cDNAs de genes alvo por PCR em tempo real

A análise de alterações na expressão dos genes envolvidos no processo apoptótico *BAX*, *BCL2* e *CASP3* na presença do composto em estudo foi realizada através da amplificação dos cDNAs sintetizados (ponto 2.6.2) por reacções de PCR em tempo real. Para este ensaio, utilizou-se o *Kit SensiFAST™ SYBR No-ROX* (Bioline), no entanto efetuou-se algumas alterações ao protocolo do fabricante. A variação da expressão dos genes em estudo foi normalizada com base no valor de expressão para o gene *rRNA18S5* (controlo interno) (Livak e Schmittgen, 2001). Na tabela 2.2 estão representadas as sequências dos *primers forward* e *reverse* (Metabion, Martinsried, Deutschland), bem como o tamanho do amplicão em pares de bases (pb), para cada gene referido anteriormente.

Tabela 2.2 - Sequência dos *primers forward* e *reverse* e tamanho do amplicão para cada gene em estudo.

Genes	<i>primer forward</i> (5'-3')	<i>primer reverse</i> (5'-3')	Amplicão (pb)	Referência
<i>BAX</i>	TGCTTCAGGGTTTCATCCAGGA	ACGGCGGCAATCATCTCTG	172	Li <i>et al.</i> , 2010
<i>BCL2</i>	CTTCGCCGAGATGTCCAGCCA	CGCTCTCCACACACATGACCC	152	
<i>CASP3</i>	TACCACTGGAGGCCGACTTC	GCACAAAGCGACTGGATGAAC	103	
<i>RNA18S5</i>	GTAACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	151	

Prepararam-se as *mastermixes* para as reacções de PCR, com volume final de 10 µL, contendo 5 µL de 2x mix *SensiFAST SYBR No-ROX*, DNA molde (85 ng), concentrações variáveis de *primers forward* e *primers reverse* (tabela 2.3), e água destilada (dH₂O) até perfazer os 10 µL.

Tabela 2.1 – Concentrações utilizadas de *primers forward* e *reverse* para a amplificação dos genes

RNA18S5, *BAX*, *BCL-2*, *CASP-3*.

Genes	<i>primers forward e reverse</i> (pmol/µL)
<i>RNA18S5</i>	0,24
<i>BAX</i>	0,24
<i>BCL-2</i>	0,15
<i>CASP-3</i>	0,24

Para a amplificação dos genes *BAX*, *BCL2*, *CASP3* e *RNA18S5* que codifica as proteínas Bax, Bcl-2 e caspase-3 e rRNA 18S5 respetivamente, utilizou-se o aparelho LightCycler® 480 (Roche, Basel, Suíça), seguindo o programa descrito na tabela 2.4.

Tabela 2.4 - Programa de PCR utilizado para amplificação dos genes *BAX*, *BCL2*, *CASP3* e *rRNA18S5* das amostras de cDNA.

Ciclo Térmico	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação inicial	1	94	2min
Desnaturação	50	94	5s
Annealing		59-65	10s
Extensão		72	10s

A deteção dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese em gel de agarose (Bioline) a 2% (p/v), corado com 2 % (v/v) de GelRed (10000x) (Biotarget, Portugal), a 110 V durante 50 min, em solução tampão TAE 1x (composição TAE 10x: 1,7 M de NaCl, 0,03 M de KCl, 0,1 M de Na₂HPO₄ e 0,01 M de K₂HPO₄). O marcador de pesos moleculares utilizado foi o *HyperLadder IV* (Bioline). O gel foi visualizado posteriormente num transiluminador *UVIpure* (UVITEC, Cambridge, Reino Unido) sob luz UV, e fotografado com uma câmara *Kodak AlphaDigiDoc* (Alpha Innotech, Califórnia, EUA). A aquisição da imagem foi efetuada através do *software AlphaEaseFC* (Alpha Innotech).

A quantificação da variação relativa da expressão dos genes utilizando o PCR em tempo real (qPCR) requer a aplicação do método comparativo de *threshold* (Ct), e a indução do *fold* das amostras foram comparadas com as amostras tratadas. Os resultados foram expressos em relação ao gene de referência, utilizando a seguinte fórmula (3):

$$(3) \quad \Delta Ct = (Ct_{\text{Genes Alvo}} - Ct_{\text{RNA18S5}})$$

Para determinar os níveis de expressão relativa, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$(4) \quad \Delta\Delta CT = (\Delta Ct_{\text{Genes tratados}} - \Delta Ct_{\text{RNA18S5}})$$

Assim, variação do *fold* nos genes alvos foram normalizados relativamente ao controlo interno. Por fim, o valor da variação da expressão dos genes alvo foi determinado utilizando a

expressão da $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A média e o desvio padrão são, então, determinados a partir das amostras em triplicado (Livak e Schmittgen, 2001; Alshatwi, 2010).

2.6 Progressão do Ciclo Celular

A análise da progressão do ciclo celular foi efetuada no âmbito de um protocolo previamente estabelecido com a Professora Doutora Paula Videira.

Para esta análise utilizou-se a linha celular tumoral HCT116, cujas células foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² com uma densidade celular final de 1×10^5 células/mL e incubadas durante 8h a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. As células foram sincronizadas por um duplo bloqueio com timidina, de forma a ficarem retidas no início da fase S (Borrvalho *et al.*, 2009). O protocolo seguinte foi realizado de acordo com o descrito por Borrvalho e colaboradores (2009). Após as 8 h de incubação na presença do composto ZM-II, as células foram sujeitas a um primeiro bloqueio pela adição de 2 mM de timidina (Sigma) ao meio de cultura e incubação durante 14 h a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. Em seguida, removeu-se o meio com timidina, adicionou-se meio fresco e incubaram-se os frascos durante 10 horas nas mesmas condições anteriores. Seguidamente, as células foram novamente expostas a uma solução de 2 mM de timidina em meio de cultura (2º bloqueio) e incubaram-se por 14 h a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. Após este período de incubação, removeu-se o meio com timidina e incubaram-se as células com 0,05 µM do composto em estudo ou 0,1 % (v/v) de DMSO (controlo), e incubaram-se as células a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, por períodos de 8 e 24 h. As células de uma das culturas foram fixadas, de acordo com o protocolo descrito em seguida, imediatamente após a terminação do segundo bloqueio (0 h) e utilizadas como controlo do método de sincronização.

O meio de cultura foi recolhido para tubos BD Falcon de 15 mL (BD Biosciences) juntamente com as células colhidas após tripsinização (5 mL de tripsina durante 5 min a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa) e centrifugou-se a 1500 rpm durante 5 minutos, eliminando-se por fim os sobrenadantes. Em seguida, as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS 1x gelado para lavagem e centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos, eliminando-se novamente os sobrenadantes. Ressuspenderam-se os sedimentos obtidos em 1 mL de PBS 1x gelado, e seguidamente foi adicionado gota a gota, 1 mL de uma solução gelada de etanol a 80 %, com agitação suave em vórtex, para fixação das células. As amostras foram mantidas em gelo por um período de 30 min, sendo de seguida armazenadas a 4 °C no mínimo durante 18 h. Os tubos foram centrifugados a 2000 rpm durante 5 min, desprezaram-se os sobrenadantes, e ressuspenderam-se os sedimentos em 1 mL de uma solução de IP (50 µg/mL) em 250 µL de

uma solução de 50 µg/mL de RNase A em PBS 1x. e incubaram-se as amostras na ausência de luz durante 30 min à temperatura ambiente.

A análise da progressão do ciclo celular após exposição ao composto com a análise da distribuição das células pelas diferentes fases do ciclo celular foi efetuada por citometria de fluxo, no citómetro de fluxo *Attune® Cytometric software* (Life Technologies), pela aquisição de 10000 eventos por amostra. O ensaio foi realizado em triplicado.

2.7 Estudos da Interação do compostos ZM-II com o DNA

2.7.1 Espectroscopia de Absorção (Titulação UV)

Com o intuito de caracterizar inicialmente a interação entre o composto ZM-II e a molécula de DNA, foram utilizados ensaios de espectroscopia de absorção. A interação do ZM-II com o DNA foi avaliada utilizando DNA de timo de bezerro (CT-DNA, do inglês *Calf Thymus-DNA*; Invitrogen). A concentração de CT-DNA, por nucleótido, foi anteriormente determinada pela leitura de absorvância a 260 nm em *NanoDrop*, e utilização do coeficiente de extinção molar de $6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, com posterior aplicação da lei de Lambert-Beer, equação (5):

$$(5) A = \epsilon \cdot \ell \cdot C,$$

em que A corresponde à absorvância, ϵ ($\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$) ao coeficiente de extinção molar, ℓ (cm) ao percurso ótico e C ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) à concentração da espécie (Gallego *et al.*, 2011).

Seguidamente foram preparadas várias soluções, contendo tampão 5 mM Tris HCl (Merck), 50 mM NaCl (Panreac), pH 7,02, adicionou-se o CT-DNA em concentrações crescentes (0 a 27 µM). A cada uma das soluções foram adicionados uma concentração fixa de 5 µM de composto ou 0,01 % de DMSO (solução de referência). Posteriormente, as soluções foram incubadas a 37°C durante 24h. Após este período, foram traçados os espectros de absorção na região dos UV-Visível (entre 230 e 400 nm), este foram adquiridos a partir do espectrofotómetro *Evolution 300-UV-Vis* (Thermo Scientific) de feixe duplo. Para a determinação da constante de afinidade para o DNA (K_b) dos compostos ao DNA, utilizaram-se os valores de absorvância a 287 nm, correspondentes ao comprimento de onda no qual se verifica o máximo de absorvância para o composto, que foram corrigidos por subtração dos valores de absorvância no mesmo comprimento de onda obtidos para o controlo (0,01 %). Desta forma, a constante de ligação foi estimada por aplicação da equação (6):

$$(6) \quad \frac{[\text{DNA}]}{\epsilon_A - \epsilon_f} = \frac{[\text{DNA}]}{\epsilon_B - \epsilon_f} + \frac{1}{K_b (\epsilon_B - \epsilon_f)}$$

onde a [DNA] (μM) corresponde à concentração de DNA; ϵ_f ao coeficiente de extinção molar do composto na sua forma livre, determinado pela equação de Lambert-Beer, através do declive de uma reta de calibração resultante de um espectro traçado entre a absorvância a 287 nm vs a concentração do composto ($3 \mu\text{M}$) em tampão 5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7; ϵ_b ao coeficiente de extinção molar do composto quando ligado ao DNA; ϵ_a ao coeficiente de extinção molar aparente calculado através da fórmula $\text{Abs}_{\text{Corrigida}} / [\text{Composto}]$; e K_b (M^{-1}) à constante de afinidade para o DNA, que por sua vez foi determinada pela razão entre o declive ($1/(\epsilon_b - \epsilon_f)$) e a ordenada na origem ($1/K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)$) de uma reta resultante de um ajuste linear ao gráfico $[\text{DNA}](\epsilon_a - \epsilon_f)$ vs $[\text{DNA}]$ (equação 6). O ensaio foi efetuado em triplicado.

2.7.2 Ensaio de Retardamento da Mobilidade Electroforética (EMSA)

2.7.2.1 Cultura de *Escherichia coli*

Para a realização dos ensaios de EMSA utilizou-se DNA plasmídico *pBluescript II SK⁺* (pBSK II; Agilent Technologies, Califórnia, EUA). As células de *Escherichia coli* da estirpe DH5 α transformadas com o plasmídeo pBSK II foram cultivadas em meio de cultura *Luria-Bertani* (LB; Applichem, Darmstadt, Alemanha) suplementado com ampicilina ($100 \mu\text{g/mL}$) (Bioline), por um período de 16 h a 37°C , numa incubadora G25 (News Brunswick Scientific, New Jersey, EUA) com agitação orbital de 250 rpm.

2.7.2.2 Extração de DNA Plasmídico (pBSKII)

O DNA plasmídico (pBSK II) foi extraído recorrendo ao *kit* de extração *NZYMiniprep* (Nzytech, Portugal), de acordo com as instruções do fabricante, à exceção do passo de eluição que foi realizado pela adição de tampão 50 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, pH 7,25, pré-aquecido a 70°C . O DNA plasmídico pBSKII foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm, no *Nanodrop*. O grau de pureza do DNA plasmídico foi igualmente avaliado no *NanoDrop*, com base nas razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} . A razão $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$ deve ser de cerca de 1,8 para amostras consideradas puras (NanoDrop Technical Support Bulletin, T009, NanoDrop Technologies Inc. 2007). Por outro lado, a razão $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{230}$ deve estar entre 2,0 a 2,2, uma vez que valores inferiores são indicadores de contaminantes que absorvem a 230 nm (NanoDrop Technical Support Bulletin, T009, NanoDrop Technologies Inc. 2007). A integridade

do DNA plasmídico foi observada por eletroforese em gel de agarose a 0,8 % (p/v) em solução TAE 1x, corado com 2 % (v/v) de GelRed.

2.7.2.3 Procedimento EMSA

O DNA plasmídico pBSK II (200 ng por amostra) foi incubado durante 24 h a 37 °C na presença de concentrações crescentes do composto em estudo (de 10 a 100 µM), ou 9,5 % (v/v) de DMSO (controle), em tampão 5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7,02, num volume reacional final de 20 µL. Após incubação, as amostras foram sujeitas a eletroforese em gel de agarose a 0,7 % (p/v) em tampão TAE 1x, a 80 V durante 2 h e 30 min. Utilizou-se o λ DNA/HindIII (Fermentas, Maryland, EUA) como marcador de pesos moleculares. O gel foi posteriormente corado numa solução de brometo de etídio (Invitrogen) a 0,05 µg mL⁻¹ em 100 mL de dH₂O, durante 30 minutos, com agitação. O gel foi visualizado no transiluminador UVIpure e as imagens adquiridas através da câmara Kodak AlphaDigiDoc e do software AlphaEaseFC. A análise dos géis foi efetuada por densitometria através do software GelAnalyzer (www.gelalyzer.com). Os ensaios foram realizados em triplicado.

2.7.2.4 EMSA na Dependência do Tempo

Neste ensaio, o DNA plasmídico pBSK II (200 ng por amostra) foi incubado a diferentes tempos 1, 5, 20, 24 e 48 h, a 37 °C, com o composto nas concentrações de 10 e 50 µM, e o controle (9,5 % (v/v) de DMSO) foi apenas incubado a 48 h, em tampão 5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7,02, num volume reacional final de 20 µL. Após incubação, adicionaram-se 5 µL de tampão de deposição contendo 25 mM de EDTA a cada amostra, com o intuito de parar a reação de interação entre o DNA e o composto em estudo. De seguida, as amostras foram colocadas em gelo durante 30 min e guardadas a 4 °C. A eletroforese em gel de agarose e a aquisição dos géis foram efetuados tal como descritos no ponto anterior (ponto 2.7.2.3). A análise dos géis foi efetuada novamente por densitometria utilizando software GelAnalyzer. Os ensaios foram realizados em triplicado.

2.8 Deteção de quebras no DNA – Eletroforese em gel de célula única ou Ensaio Comet

Com o intuito de quantificar a quantidade de DNA fragmentado, resultante de quebras simples ou duplas na molécula de DNA, o ensaio COMET revela-se como um método eficaz, sendo considerado um teste de avaliação de genotoxicidade (Collins *et al.* 2008; Singh *et al.*, 1998; Collins *et al.* 1997,).

2.8.1 Preparação das lâminas

Para os ensaios *Comet* foram utilizadas lâminas de extremidade fosca para fácil identificação. As lâminas foram limpas, com álcool a 70 % e secas com papel absorvente. Posteriormente colocou-se agarose de elevado ponto de fusão (HMPA) a 1,5 % (p/v) derretida num copo de Coplin e mergulharam-se as lâminas, retirando-as de imediato e limpando a parte inferior de modo a ter apenas uma face coberta por agarose. Deixou-se a agarose polimerizar durante 48 h a 37 °C.

2.8.2 Exposição das Células e Preparação das Amostras

Para este ensaio, células da linha tumoral HCT116 foram cultivadas em placas de 35 mm (Orange Scientific) numa concentração celular de 5×10^5 células/mL e incubadas durante 24 h a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. Seguidamente, as células foram incubadas na presença do composto ZM-II nas concentrações de 0,05 e 0,1 µM (diluições da solução *stock* em meio de cultura completo) e 0,1 % (v/v) de DMSO (controlo negativo), durante 24 h a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. Foi ainda preparado um segundo controlo negativo sem adição do composto ou de DMSO, e incubou-se nas mesmas condições referidas acima. Como controlo positivo foi utilizado o peróxido de hidrogénio (H₂O₂; Sigma) a 0,05 % (v/v), incubando-se 30 min à temperatura ambiente. Posteriormente, removeu-se o meio completo e adicionou-se 1 mL de PBS 1x para recolha das células através do método de *scraping*. A suspensão celular foi sujeita a uma centrifugação a 700 xg durante 2 min, com eliminação dos sobrenadantes. Posteriormente, as células foram lavadas com 1 mL de PBS 1x gelado, e centrifugadas novamente nas mesmas condições, eliminando-se os sobrenadantes. Os sedimentos celulares foram ressuspensos em 1 mL de PBS 1x gelado e procedeu-se à contagem das células através do método de exclusão por azul de *Trypan*. Preparou-se uma solução com densidade celular de 1×10^5 células/mL em 1 mL de PBS 1x gelado.

Para o ensaio *Comet* preparam-se previamente as soluções de lise, neutralização e alcalina, que são armazenadas a 4 °C.

As lâminas para cada amostra foram preparadas pela adição da suspensão celular com a agarose de baixo ponto de fusão (LMPA; constituída por 10 mL de LMPA, 0,1 g de agarose e 10 mL de PBS) numa razão de 1:10. Adicionaram-se 90 µL desta solução na respectiva lâmina com HMPA, cobrindo-se imediatamente com uma lamela de modo a espalhar uniformemente a amostra juntamente com LMPA. Colocaram-se as lâminas na horizontal a 4°C, durante 30 min

na ausência de luz até solidificarem. Após este período, removeram-se as lamelas e as células foram colocadas num copo de Coplin em 100 mL da solução de lise (13,2 g de NaCl, 18,6 g de EDTA (Sigma) e 1,25 mL de Tris Base 4M (CALBIOCHEM, Canada), perfazendo com dH₂O até 500 mL, pH 10) suplementada com 1 mL de TrintonX-100 (Sigma) e 10 mL de DMSO (adicionados imediatamente antes da utilização da solução de lise), igualmente a 4 °C, por 45 min, na ausência de luz. As lâminas foram posteriormente expostas a uma solução alcalina (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13), por 30 min a 4 °C, na ausência de luz.

2.8.3 Eletroforese Alcalina

As lâminas foram colocadas na tina de eletroforese contendo a solução de eletroforese, a solução alcalina, num volume suficiente apenas para cobrir as lâminas. As lâminas foram colocadas em paralelo à direcção da corrente. Procedeu-se à eletroforese a 25 V (400 mA) durante 30 min a 4°C. Seguidamente, as lâminas foram colocadas na solução de neutralização (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) durante 15 min a 4 °C, na ausência de luz, e posteriormente numa solução de metanol e incubadas durante 15 min a 4 °C, na ausência de luz. De seguida, deixam-se as lâminas a secar ao ar durante alguns minutos e posteriormente são colocadas numa estufa (Lab-Line) a 37 °C até a análise das lâminas.

2.8.4 Visualização e análise das lâminas

Para a análise das lâminas procede-se à sua re-hidratação com dH₂O durante pelo menos 30 min e de seguida estas foram coradas com uma solução de brometo de etídio (2 mg/mL), colocando sobre as lâminas 20 µL e colocando de imediato uma lamela. As lâminas foram visualizadas num microscópio de fluorescência (Leica DFC 480) recorrendo ao programa Optika Vision Pro (Optika, Itália) para aquisição das imagens. Posteriormente, as imagens foram analisadas no programa *CometScore* (Tritek) (<http://autocomet.com>).

2.9 Análise Proteómica

2.9.1 Exposição das células ao composto ZM-II e extração dos extratos de proteína total

A linha celular tumoral HCT116 foi utilizada para a realização dos ensaios de proteómica, que se basearam na realização da técnica de eletroforese bidimensional (2-DE eletroforese) dividida em duas dimensões: a 1ª dimensão consiste na focagem isoeléctrica e a 2ª dimensão na realização de géis SDS-PAGE. As células desta linha foram cultivadas em 5 frascos de cultura

de 25 cm², com uma densidade celular de 2x10⁵ células/mL e incubadas a 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ e 99 % de humidade relativa, durante 24 h. Posteriormente, para incubação das células ao composto, aspirou-se o meio de cultura antigo e adicionou-se, a cada frasco, 2 mL de uma solução de composto à concentração de 0,08 µM em meio de cultura completo ou 2 mL de uma solução a 0,15 % (v/v) de DMSO em meio de cultura (controlo). Os frascos de cultura foram incubados por 24 h a 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ e 99 % de humidade relativa. Após este período, para obtenção das células aspirou-se novamente o meio de cultura e adicionaram-se 1,5 mL de tripsina, durante 5 min, 37 °C, 5 (v/v) % CO₂ e 99 % de humidade relativa, e centrifugou-se a 2500 rpm, durante 5 min. Os sedimentos celulares foram lavados três vezes com 1 mL de PBS 1x e centrifugados a 2500 rpm durante 5 min. De seguida, preparou-se, em gelo, uma solução de lise contendo 1x de inibidores de fosfatases (PhosStop, Roche, Basel, Suíça), 1x de inibidores de proteases (Complete Mini, Roche), 0,1 % (p/v) de ditioneitol (DTT; Promega, Madison, EUA) e 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF; Sigma) em tampão de NaCl-Tris-EDTA (150 mM NaCl; 50 mM Tris; pH8; 5 mM EDTA; 2 % (p/v) de NP-40 (Thermo Scientific)). Os sedimentos obtidos anteriormente foram ressuspensos em 200 µL da solução anterior e incubaram-se em gelo durante 1 hora. Posteriormente, observou-se o estado de lise celular das amostras ao microscópio *Olympus* BX51 em preparações contendo 5 µL da suspensão de lise celular. Por fim, as soluções preparadas anteriormente foram centrifugadas à velocidade máxima (14 000 xg) durante 10 min e recuperou-se o sobrenadante. Para purificação das amostras, utilizou-se o *2-D Clean-Up Kit* (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) de acordo com as indicações descritas pelo fabricante, até ao passo de adição do tampão de lavagem *wash buffer* e do *wash additive*, no qual se procedeu a uma incubação *overnight* a -20 °C, em vez de um período de incubação de apenas 30 min. A restante amostra não utilizada foi armazenada a -80 °C.

A cada amostra purificada foi adicionada 150 µL de uma solução de rehidratação, constituída por 120 µL de tampão de rehidratação (8 M Ureia (Sigma), 2 % (p/v) de CHAPS (GE Healthcare), 0,5 % (v/v) de tampão IPG pharmalyte pH 3-10 (GE Healthcare) e vestígios de azul de bromofenol (Riedel-de Haën, Saint Louis, EUA)), 0,6 µL de DTT a 10 % (p/v), 0,6 µL de PMSF a 100 mM, 15 µL de inibidores de fosfatases e 15 µL de inibidores de proteases (estes últimos quatro componentes adicionados no momento da utilização da solução de rehidratação), e estas foram mantidas durante pelo menos 2 h à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14 000 x g durante 15 min para eliminação das proteínas não solubilizadas, recuperando assim o sobrenadante. Quantificou-se o extrato de proteína total através do *Pierce Protein Assay Kit* (ThermoScientific). Para tal, traçou-se uma reta de calibração de padrões Albumina sérica bovina (BSA, do inglês *Bovine serum albumin*)

com concentrações desde 125-1000 µg/mL, preparados pela adição de 50 µL de cada uma das soluções padrão e 750 µL do reagente de Pierce. Para quantificação das amostras foram preparadas usando 10 µL de amostra, 90 µL de água destilada e 1,5 mL de reagente de Pierce. As soluções permaneceram durante 5 min à temperatura ambiente. De seguida, mediu-se a absorvância a 660 nm no *NanoDrop2000* utilizando uma solução de 50 µL de água destilada em 750 µL de reagente de Pierce como o zero da reta de calibração.

2.9.2 Focagem Isoelétrica (1ª Dimensão)

Os volumes correspondentes a 200 µg de extrato de proteína total para cada amostra foram depositados ao longo de um suporte cerâmico de tiras de 7 cm *IPG strip holder* (GE Healthcare) e em cada um destes foi colocada uma tira *Immobiline DryStrip* pH 3-10 NL de 7 cm (GE Healthcare), tendo o cuidado de colocar a face com gel em contato com a amostra, evitando ainda a formação de bolhas entre o gel e a amostra. Posteriormente, adicionou-se 750 µL de *Drystrip Cover Fluid* (GE Healthcare) e a tampa dos suportes de modo a selá-los e de seguida foram colocados no aparelho de focagem isoelétrica Ettan IPGphor3 IEF System (GE Healthcare), executando o programa descrito na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 - Condições utilizadas em cada um dos passos do programa de focagem isoelétrica.

Passo	Duração (h)	Voltagem (V)	Temperatura (°C)
1	12	30	20
2	0,5	100	
3	0,5	500	
4	0,5	1000	
5	1	5000	

2.9.3 SDS-PAGE (2ª Dimensão)

Para a realização dos géis SDS-PAGE utilizou-se o sistema SDS-PAGE Mini-PROTEAN® 3 System (BioRad). Prepararam-se os géis de poliacrilamida a 12,5 % (v/v) constituídos por 4 mL de acrilamida/bis-acrilamida 30 % (Merck, Darmstadt, Alemanha), 2,5 mL de tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 (Calbiochem), 3,5 mL de dH₂O, 75 µL de persulfato de amónia (APS; Biorad, Califórnia, EUA), 10 µL de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED; Sigma). Os géis foram colocados nas cassetes do sistema previamente montado, e posteriormente foram selados

com dH₂O e deixados a polimerizar por cerca de 30 min. Após este período, removeu-se a dH₂O por inversão da cassete e com o auxílio de papel de filtro.

Após a focagem isoelétrica, as tiras foram equilibradas através de duas fases, colocando as tiras em 5mL de uma solução de equilíbrio (1,5 M de Tris-HCl pH 8,8 (Calbiochem), 360,35 g/L de ureia (Scharlau), 354 mL/L de glicerol 30% (v/v) (Panreac, Barcelona, Espanha), 20 g/L de dodecilsulfato de sódio (SDS; Riedel-de Haën), e vestígios de azul de bromofenol) contendo 1 % (p/v) de DTT, durante 15 min com agitação horizontal. Repetiu-se o procedimento adicionando à solução de equilíbrio 2,5 % (p/v) de iodoacetamida (GE Healthcare) durante 15 min com agitação horizontal. As tiras foram posteriormente colocadas sobre os géis de SDS-PAGE adicionando-se ainda o marcador de pesos moleculares HyperPAGE I (Bioline) aplicado numa tira de papel de filtro. Posteriormente os géis foram cobertos com solução de agarose 0,5 % (p/v) (Lonza) em tampão de eletroforese (3,79 g/L de Tris-base (Calbiochem), 18 g/L de glicina (Panreac), 1,25 g/L de SDS, e vestígios de azul de bromofenol).

Os géis foram então colocados na tina de eletroforese (BioRad PROTEAN II xi Cell), e a eletroforese foi iniciada a uma voltagem constante de 30 V nos primeiros 30 min, para facilitar a transferência das proteínas da tira para o gel de SDS-PAGE, e de seguida deu-se a 150 V até o azul de bromofenol presente no gel atingir a extremidade oposta do gel, e assim encontrar-se dissipado no tampão de eletroforese.

Os géis foram corados com uma solução de azul Coomassie Coloidal R350 constituída por três pastilhas de *PhasTGel™ Blue R* (GE Healthcare) dissolvidas em 1 L de ácido acético a 10 % (v/v) (Panreac) em dH₂O. Esta solução foi aquecida no microondas durante 2 minutos a 900 Watts (W) e os géis ficaram em agitação durante 20 minutos, após os quais se repetiu o procedimento mais duas vezes. Para a remoção do corante procedeu-se a várias lavagens com dH₂O aquecida pelo mesmo procedimento indicado acima até atingir um contraste adequando para visualização dos *spots* de proteínas.

2.9.4 Análise de géis bidimensionais - Procedimento

Os géis foram adquiridos por digitalização utilizando o *scanner* PIXMA M250 (Canon). A análise e comparação dos níveis de expressão foram efetuadas pela utilização do programa Melanie 7.0 (Genebio, Genebra, Suíça). A análise foi realizada por deteção automática dos *spots* de proteínas seguindo-se a correspondência desses *spots* entre diferentes géis de diferentes amostras a determinação da intensidade de cada *spot*. A variação da expressão proteica na amostra tratada pelo composto foi obtida através da razão entre a intensidade de cada *spot* proteico do gel tratado com o composto e de cada *spot* proteico do gel tratado com

apenas DMSO. Para razões de expressão consideradas significativas ($\leq 0,7$ e $\geq 1,5$) os *spots* correspondentes foram excisados dos géis e analisados por espectroscopia de massa Maldi-TOF no Instituto de Tecnologias de Química e Biologia (ITQB). Os ensaios foram realizados em triplicado.

2.10 Detecção da Indução de Espécies Reativas de Oxigénio

Com o intuito de detetar a formação de ROS na presença do composto ZM-II, foi analisada a atividade da enzima de *stress* oxidativo glutationa S-transferase bem como a indução de peroxidação lipídica. Para tal células da linha tumoral HCT116 foram expostas ao composto ZM-II na concentração de $0,05 \mu\text{M}$ e o extrato de proteína total obtido, como descrito no ponto 2.8.1, não se procedendo à purificação do extrato proteico. O extrato proteico total foi quantificado através do *Pierce Protein Assay Kit*, como descrito no ponto 2.8.1.

2.10.1 Ensaio da Glutathione S-Transferase

A Glutathione S-transferase (GST) pertence a um grupo de enzimas importantes na desintoxicação promovida por diferentes xenobióticos nas células de mamíferos. Esta enzima protege as células contra diversos compostos tóxicos por conjugação do grupo tiol da glutathione com os xenobióticos electrófilos, e portanto protege contra a mutagénese, carcinogénese e efeitos tóxicos dos compostos (Sigma, 2007).

Este ensaio foi realizado utilizando o *Glutathione S-Transferase Assay Kit* (Sigma), que se baseia no 1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), um substrato apropriado para a ampla gama de isoenzimas de GST. A conjugação do grupo tiol da glutathione com o substrato CDNB induz um aumento na absorvância a 340 nm.

O ensaio foi efetuado formulando a solução do substrato (10 mL de volume final) constituída por *Dulbecco's Phosphate Buffered saline*, 200 mM *L-Glutathione reduced* e 100 mM de CDNB. Adicionaram-se, a cada poço de uma placa de 96 poços, todos os componentes para a reação enzimática para um volume final de $200 \mu\text{L}$, de acordo com a Tabela 2.6. O controlo positivo foi formulado a partir da GST de fígado de cavalo. Seguidamente procedeu-se à leitura da absorvância a 340 nm num leitor de microplacas Infinite 200 PRO microplate reader (TECAN), efetuando-se a leitura de 1 em 1 min por um período de 8min. Cada amostra foi lida em três replicados.

Tabela 2.6 - Quantidade da solução de substrato e enzima (amostra ou controlo) necessário para a realização da reação enzimática da GST, com um volume final de 200 µL.

Reação	Controlo e Amostras	Branco
Solução do Substrato	180 µL	200 µL
GST	20 µL	-

A análise dos resultados é efetuada pela construção de um gráfico da absorvância versus tempo, tendo por base que o aumento da absorvância é diretamente proporcional à atividade de GST. A partir do declive do gráfico determina-se a absorvância da amostra por minuto, (ΔA_{340})/minuto. A atividade da enzima GST foi calculada através da equação (7):

$$(7) \quad \frac{(\Delta A_{340})/\text{minutos} \times V(\text{mL})}{\epsilon_{mM} \times V_{enz}(\text{mL})} = \mu\text{mol/mL/min},$$

onde, ϵ_{mM} (mM^{-1}) é o coeficiente de extinção molar a 340 nm do CDNB quando complexado ($5,3 \text{ mM}^{-1}$), $V(\text{mL})$ o volume de reacional total, V_{enz} (mL) o volume de amostra em estudo. Os resultados obtidos foram normalizados à concentração do extrato proteico total. Os resultados foram realizados em duplicado.

2.10.2 Análise de Peroxidação lipídica - Método TBARS (Thiobarbituric acid reactive species)

O método TBARS para a análise de peroxidação lipídica, baseia-se na capacidade do malondialdeído (MDA), o qual é um dos produtos secundários da peroxidação lipídica, em reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA), que ao reagirem em condições ácidas e a elevadas temperaturas, formam um complexo MDA - (TBA)₂, que pode ser quantificado a 532 nm. O método TBARS mede a quantidade de MDA gerado durante a peroxidação lipídica (Sochor *et al*, 2012).

Adicionaram-se 5 µL do extrato de proteína total (ou controlo) a 45 µL de tampão fosfato (50 mM NaH_2PO_4 , pH 7,0; Sigma), suplementado com 2 mM de EDTA (Riedel-Haën), 12,5 µL de SDS a 8,1 % (Merk), 93,5 µL de ácido tricloroacético a 20 % (TCA; Merk) pH 3,5, 93,5 µL de TBA a 1 % (Merk), e 50,5 µL de água Mili-Q e tubos de 1,5 mL. De seguida, colocaram-se as amostras durante 10 min em banho com água a 100°C. Após este período, colocou-se

imediatamente em gelo, para parar a reação, e adicionaram-se 62,5 µL de água Mili-Q e 312,5 µL de uma solução *n*-butanol:piridina (15:1 v/v; Meerk). Misturaram-se as amostras com auxílio de um vortéx e centrifugaram-se a 10000 xg durante 5 min. Retiraram-se 150 µL de sobrenadante e transferiram-se para uma placa de 96 poços, e procedeu-se à leitura de absorvâncias a 532 nm num leitor de microplacas Infinite 2000 microplate reader (TECAN). Igualmente, foram adicionadas à placa de 96 poços soluções *standard* de 0 a 0,3 µM de TBARS preparadas por diluição em água destilada para a construção de uma curva de calibração dependente da concentração de MDA. Seguidamente, leu-se a absorvância. Os resultados obtidos foram normalizados à concentração do extrato proteico total. Os ensaios foram realizados em duplicado.

3. Resultados e Discussão

3.1 Avaliação do Potencial Citotóxico

Na identificação de novos compostos com atividade anti-tumoral é necessária a avaliação *in vitro* do potencial citotóxico em culturas de células tumorais (O'Toole *et al.*, 2003). O perfil de citotoxicidade inferido a partir da taxa de viabilidade celular de um composto de interesse pode ser avaliada através de métodos que medem a atividade de enzimas mitocondriais presente exclusivamente em células viáveis, como é o caso do MTS (McGowan *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010). O MTS, um sal de tetrazólio de coloração amarela, é reduzido por desidrogenases mitocondriais em células metabolicamente ativas, formando assim um formazano aquoso e solúvel de coloração acastanhada (O'Toole *et al.*, 2003). A intensidade da coloração produzida é proporcional ao número de células viáveis (Wang *et al.*, 2010).

O potencial citotóxico do composto ZM-II foi avaliado em três linhas celulares tumorais, nomeadamente HCT116, HepG2 e MCF-7, pela aplicação de concentrações crescentes do composto e exposição ao mesmo por um período de 48 horas. As taxas de viabilidade celular obtidas para as três linhas tumorais após tratamento com o composto ZM-II, são evidenciadas na Figura 3.1.

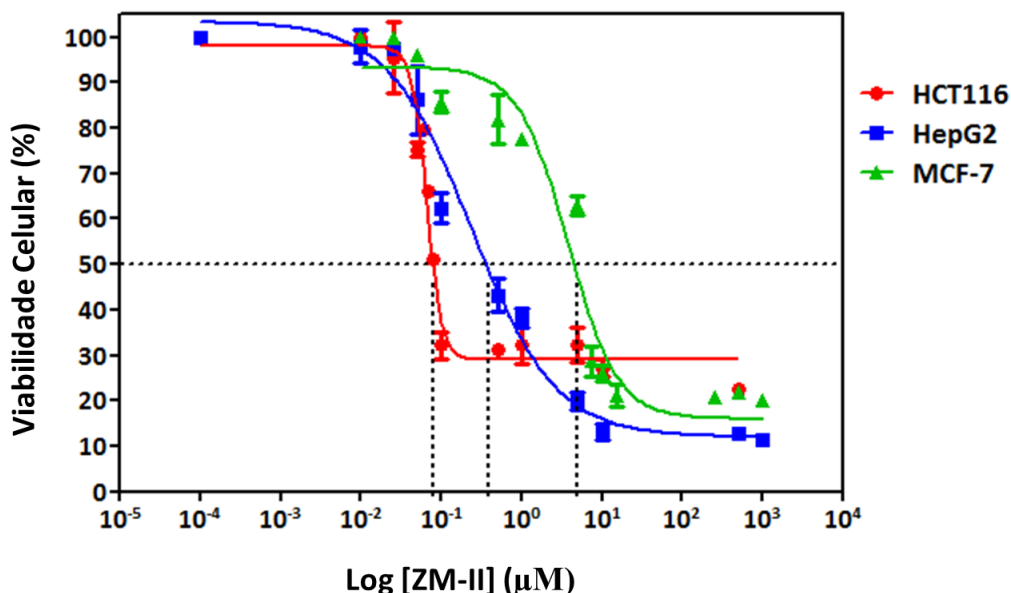


Figura 3.1 - Viabilidade celular das linhas celulares tumorais HCT116, HepG2 e MCF-7 após 48 horas de exposição ao composto ZM-II. A viabilidade celular foi determinada por MTS. Os valores apresentados são referentes à média de três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao erro padrão em relação à média (p value < 0,05). Os valores de viabilidade celular foram normalizados em relação às células incubadas sem composto, na presença de 0,1 % de DMSO (controlo). As linhas a tracejado referem-se ao cálculo de IC_{50} absoluto.

A partir da Figura 3.1 observa-se, em todas as linhas celulares tumorais, uma redução bastante significativa e gradual da viabilidade celular com o aumento da concentração do composto. De notar que a linha HCT116 apresenta uma redução na viabilidade celular mais evidente entre as concentrações 0,05 e 0,1 μM de composto, comparativamente com as linhas tumorais HepG2 e MCF-7. Estas linhas tumorais apresentam o seu efeito citotóxico observável a partir da concentração de 0,1 μM de composto. Assim, pode-se inferir que o composto ZM-II apresenta atividade antiproliferativa *in vitro*, portanto apresenta um efeito citotóxico dependente da concentração em todas as linhas tumorais estudadas (Fig. 3.1).

O valor de IC_{50} corresponde à concentração de composto necessária para redução de 50% de viabilidade celular (Li *et al.*, 2010). Os valores de IC_{50} absoluto calculados diretamente através do gráfico da Figura 3.1 para as linhas celulares em estudo após tratamento com o composto ZM-II encontram-se numa gama entre 0,05 e 0,1 μM para HCT116, 0,5 e 1 μM para HepG2 e 5 e 10 μM para MCF-7. Os valores de IC_{50} relativos foram calculados através do programa *GraphPad* e são de 0,066 ($\pm 0,005$) μM para HCT116, 0,241 ($\pm 0,015$) μM para HepG2 e 2,694 ($\pm 0,398$) μM para MCF-7. Os valores de IC_{50} mostram que o composto ZM-II apresenta uma atividade antiproliferativa em todas as linhas tumorais em estudo. Contudo, este efeito é mais evidente na linha tumoral HCT116, seguida pela linha tumoral HepG2 e, por fim, a linha tumoral MCF-7. O menor efeito citotóxico por parte do composto ZM-II relativamente à linha MCF-7 pode dever-se a uma maior resistência intrínseca por parte das células do epitélio mamário. Tem sido demonstrado que a sobre-expressão do gene BCRP em MCF-7 confere resistência a mitoxantrona, doxorrobicina e daunorrubicina, reduzindo a retenção e a acumulação de daunorrubicina, e provoca o aumento de efluxo de rodamina dependente de ATP (Doyle, 1998). Ao comparar os valores de IC_{50} obtidos para o composto ZM-II com os valores de IC_{50} descritos para a cisplatina, determinados por MTS, 4,2 μM e 15,3 μM para a linha celular tumoral HCT116 e HepG2, respetivamente (Silva, 2012). Portanto, pode-se inferir que o composto em estudo apresenta um potencial citotóxico *in vitro* superior à cisplatina em HCT116 e HepG2. Ao comparar com os valores de IC_{50} descritos para a DOX, determinados por MTS, 0,42 μM para a linha HCT116 e 0,11 μM para a linha MCF-7 (Silva, 2012; Yu *et al.*, 2012). Logo, pode-se inferir o composto em estudo apresenta maior atividade anti-proliferativa do que a DOX em HCT116, no entanto apresenta menor atividade em MCF-7.

Com o intuito de avaliar ação do composto em estudo nas linhas celulares não-tumorais, foram efetuados ensaios de citotoxicidade do composto em duas linhas celulares não tumorais, de epitélio mamário (MCF-10A) e fibroblastos, através da aplicação de concentrações crescentes do composto e exposição ao mesmo por um período de 48 horas. As

taxas de viabilidade celular obtidas para MCF-10A e fibroblastos após tratamento com o composto ZM-II, são evidenciadas na Figura 3.2.

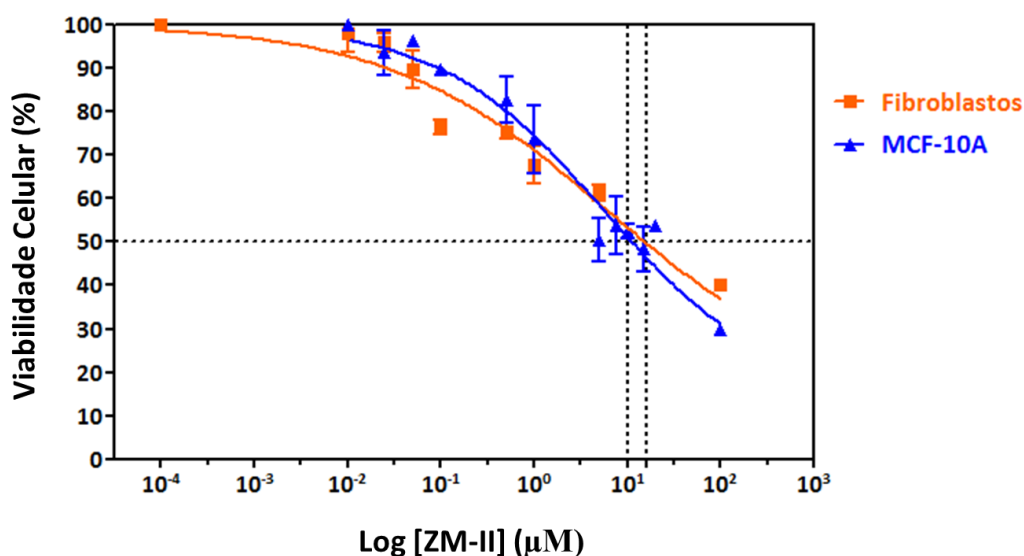


Figura 3.2 - Viabilidade celular das linhas celulares não-tumorais MCF-10A e fibroblastos após 48 horas de exposição ao composto ZM-II. A viabilidade celular foi determinada por ensaio MTS. Os valores apresentados são referentes à média de três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao erro padrão em relação à média (p value < 0,05). Os valores de viabilidade celular foram normalizados em relação às células incubadas sem composto, na presença de 0,1 % de DMSO (controlo). As linhas a tracejado referem-se ao cálculo do IC_{50} absoluto.

A partir da análise da Figura 3.2 observa-se decréscimo de viabilidade pouco acentuado para as duas linhas celulares não-tumorais. No entanto, a diminuição de viabilidade ocorre a concentrações mais elevadas, comparativamente ao observado para as linhas celulares tumorais estudadas anteriormente (Figuras 3.1).

O valor de IC_{50} pode ser retirado diretamente a partir da Figura 3.2. O valor de IC_{50} absoluto após tratamento com o composto em estudo, para a linha celular MCF-10A é aproximadamente 10 μ M e para os fibroblastos encontra-se entre 10 e 15 μ M. Os valores de IC_{50} relativo foram calculados através do programa *GraphPad*, tal como efetuado anteriormente, e valores calculados são 5,901 (\pm 0,007) μ M para MCF-10A e 5,483 (\pm 0,003) μ M para fibroblastos. Assim, pode-se depreender que o composto ZM-II apresenta um menor efeito citotóxico nestas linhas celulares comparativamente com as linhas celulares tumorais HCT116, HepG2 e MCF-7 (Figura 3.1). Portanto, pode-se concluir que o composto ZM-II parece ter seletividade para as linhas celulares tumorais HCT116, HepG2 e MCF-7. Ao comparar os valores de IC_{50} obtidos para o composto ZM-II com os valores de IC_{50} descritos, determinados por MTS, de 4,76 μ M para a cisplatina (Ho *et al.*, 2007) e entre 20 e 25 μ M DOX (Tapia *et al.*,

2007) em MCF-7. Portanto, pode-se inferir que o composto em estudo apresenta maior atividade anti-proliferativa do que a cisplatina e menor atividade do que a DOX. Assim, relativamente à citotoxicidade do composto em estudo, verifica-se que este apresenta maior efeito citotóxico do que a cisplatina e maior efeito comparativamente à DOX. Atualmente, muitos compostos quimioterapêuticos utilizados no tratamento do cancro são pouco seletivos, isto é, tanto as células tumorais como as normais são alvos destes agentes (Bharali, 2010; Feng et al., 2007). De forma geral, pode-se afirmar que o composto ZM-II apresenta menor efeito citotóxico em células de linhas não-tumorais, comparativamente com a cisplatina e a DOX, agentes quimioterapêuticos utilizados na terapêutica do cancro, tal como referido anteriormente na introdução. Verifica-se também que o composto em estudo apresenta maior seletividade para células tumorais, em comparação com a cisplatina e DOX. Assim, é importante o estudo de novos agentes com potenciais propriedades anti-tumorais, como é o caso de compostos biologicamente ativos de Cu (Iakovidis, 2011; Morzano *et al.*, 2009).

3.2 Avaliação do Potencial Apoptótico

Com o intuito de identificar o mecanismo de morte celular subjacente à perda de viabilidade celular na presença do composto ZM-II, realizaram-se ensaios de marcação nuclear com Hoechst 33258 e marcação dupla com anexina V-FITC e IP. A apoptose é um mecanismo de morte celular que permite a supressão de células sem provocar danos nas células adjacentes (Elmore, 2007). Assim, a indução de apoptose constitui o mecanismo ideal pelo qual os compostos anti-tumorais promovem a citotoxicidade em células tumorais (Lowe e Lin, 2000). Desta forma, é importante identificar o mecanismo através do qual o composto em estudo promove a sua citotoxicidade em células tumorais.

3.2.1 Marcação com a sonda de Hoechst 33258

A sonda de Hoechst 33258 é uma sonda que interage com o sulco menor do DNA (Kim *et al.*, 2003). Deste modo, esta sonda é utilizada na marcação de ácidos nucleicos, o que permite detetar alterações morfológicas ao nível do núcleo (Yan *et al.*, 2012; Cao *et al.*, 2011). As células apoptóticas apresentam núcleos com a cromatina condensada e fragmentação nuclear (Yan *et al.*, 2012; Cao *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010). Por outro lado, a membrana citoplasmática é permeável a esta sonda, o que permite a sua entrada em células viáveis, sem que a integridade membranar seja comprometida (Hoechst Stains, MP21486, Invitrogen 2005; Cao *et al.*, 2011). Logo, é possível visualizar núcleos de células que não se apresentem em apoptose, os quais apresentam a cromatina uniformemente distribuída pelo núcleo (Yan *et al.*,

2012). O potencial apoptótico do composto ZM-II foi avaliado por marcação com a sonda Hoechst 33258, testando-se três concentrações do composto (0,025, 0,05 e 0,1 μ M) nas linhas tumorais HCT116 e HepG2 (Figuras 3.3 e 3.4, respectivamente).

A partir da análise das figuras foi possível observar que as células do controlo (DMSO) apresentam uma distribuição uniforme na fluorescência dos núcleos, bem como a presença de algumas células em processo de divisão celular. Este fato permite inferir que o composto DMSO na concentração estudada (0,1 % (v/v)) não induz à apoptose e não impede a divisão celular. Por outro lado, verifica-se que as células de ambas as linhas tumorais apresentam alterações morfológicas nucleares, como a fragmentação, bem como a condensação nuclear, comparativamente ao núcleo de células normais. Segundo estudos recentes sabe-se que estas alterações morfológicas são características de células apoptóticas (Yan *et al.*, 2012; Ziegler e Groscurth, 2004) (Figuras 3.3 e 3.4). Verifica-se também que as células expostas ao composto ZM-II apresentam redução do número de células proporcional ao aumento da concentração. Assim, pode-se inferir que o composto em causa pode induzir à apoptose, apresentado, deste modo, potencial apoptótico. Estudos recentes demonstraram que alguns compostos de cobre apresentam efeito citotóxico através da sua capacidade de induzir à apoptose em várias linhas celulares (Iakovidis *et al.*, 2011; Marzano *et al.*, 2009).

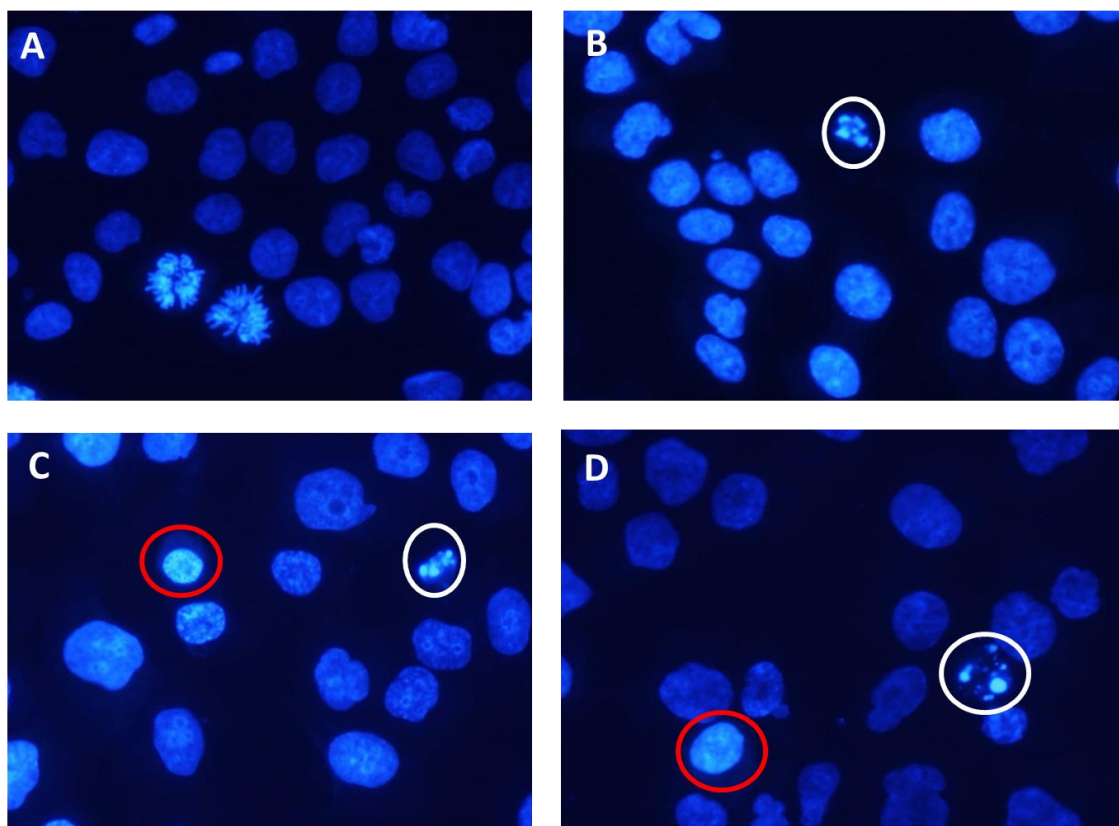


Figura 3.3 – Células da linha tumoral HCT116 marcadas com a sonda nuclear Hoechst 33258 após tratamento com ou sem o composto ZM-II nas concentrações de 0,025, 0,05 e 0,1 μM , durante 48 horas: (A) Controlo com DMSO a 0,1 % (v/v) e sem composto; (B) [ZM-II] a 0,025 μM ; (C) [ZM-II] a 0,05 μM e (D) [ZM-II] a 0,1 μM . Os círculos brancos representam a fragmentação nuclear e os círculos vermelhos a condensação da cromatina. As imagens são representativas de três ensaios independentes.

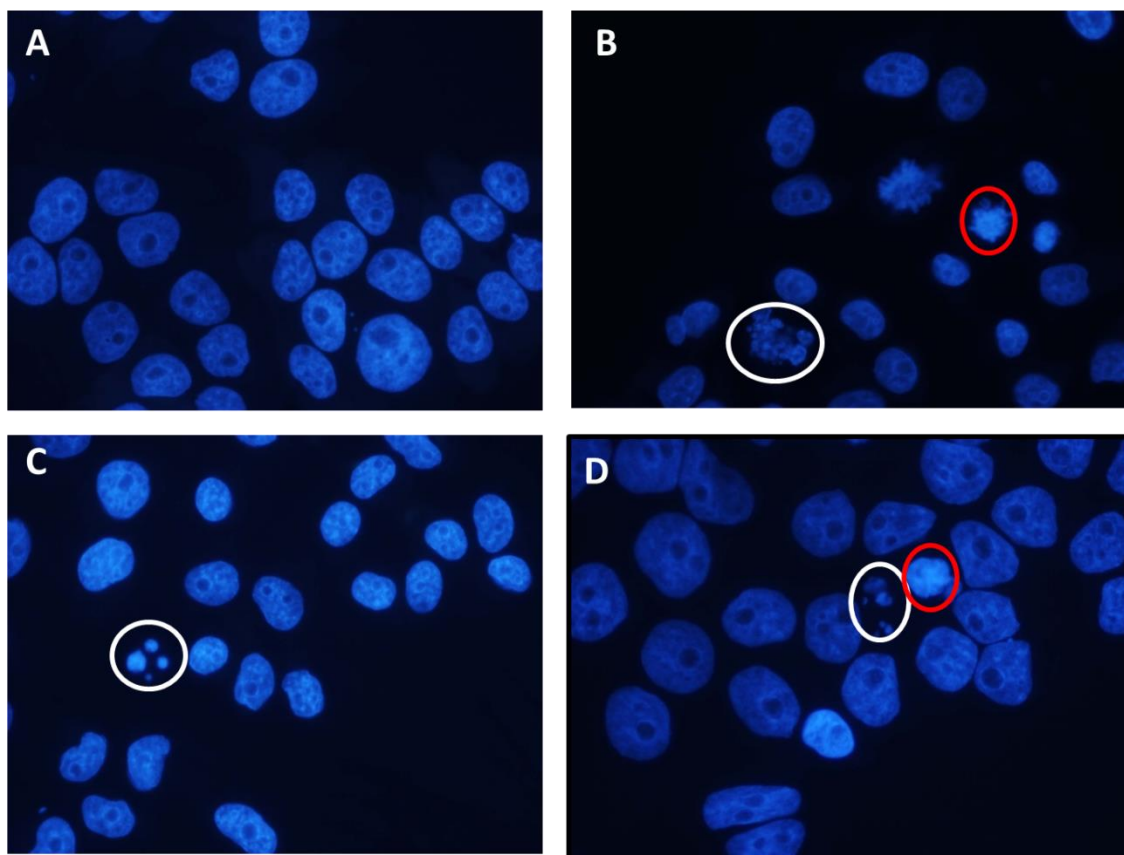


Figura 3.4 – Células da linha tumoral HepG2 marcadas com a sonda nuclear Hoechst 33258 após tratamento com ou sem o composto ZM-II nas concentrações de 0,025, 0,05 e 0,1 μM , durante 48 horas: (A) Controlo com DMSO a 0,1 % (v/v) e sem composto; (B) [ZM-II] a 0,025 μM ; (C) [ZM-II] a 0,05 μM ; e (D) [ZM-II] a 0,1 μM . Os círculos brancos representam a fragmentação nuclear e os círculos vermelhos a condensação da cromatina. As imagens são representativas de três ensaios independentes.

3.2.2 Marcação com Anexina V-FITC e IP

De forma a quantificar a indução da apoptose, observada anteriormente no ensaio de marcação com Hoechst 33258, procedeu-se à dupla marcação de células HCT116 incubadas com o composto ZM-II (0,05 e 0,1 μM) com anexina V-FITC e IP.

A Anexina V é uma proteína de ligação a fosfolípidos dependentes de Ca^{2+} com elevada afinidade de ligação para a fosfatidilserina, que se encontra permanentemente no folheto interno da membrana celular, no entanto nas células apoptóticas este fosfolípido sofre translocação da superfície interna da membrana citoplasmática para a externa (Cao *et al.*, 2011; Brumatti *et al.*, 2008). A FITC (isotiocianato de fluoresceína) consiste num fluoróforo que quando ligado à anexina V, permite a deteção de células onde ocorreu a externalização de fosfatidilserina (Brumatti *et al.*, 2008). Por outro lado, as células necróticas e as células em fases tardias do processo apoptótico apresentam perda da integridade da membrana. Assim,

estas células são permeáveis ao IP, apenas capaz de penetrar em células com a membrana citoplasmática intacta e emite fluorescência ao interagir com a molécula de DNA (Brun *et al.*, 2012). Desta forma, é possível diferenciar: células viáveis (FITC-/IP-), células apoptóticas em estádios iniciais (FITC+/IP-), células apoptóticas em estádios tardios (FITC+/IP+) e células em necrose (FITC-/IP+) (Sabbadini *et al.*, 2012; Sawai e Domae, 2011).

Os resultados obtidos encontram representados na Tabela 3.1 e na Figura 3.5.

Tabela 3.1 - Percentagem de células viáveis, apoptóticas iniciais e tardias, e necróticas na ausência (controlo 0,1 % (v/v) de DMSO) ou presença do composto ZM-II nas concentrações 0,05 e 0,1 μ M, em células HCT116, por 48 horas. Os valores apresentados são referentes à média de três ensaios independentes (p value < 0,05).

% de Células	Controlo	0,05	0,1
Viáveis	75,91 (\pm 6,04)	36,92 (\pm 3,80)	22,16 (\pm 4,68)
Apoptóticas iniciais	2,63 (\pm 0,39)	15,76 (\pm 1,19)	21,90 (\pm 0,48)
Apoptóticas tardias	17,74 (\pm 7,07)	43,89 (\pm 2,95)	53,24 (\pm 3,04)
Necróticas	3,72 (\pm 0,64)	3,43 (\pm 1,76)	2,69 (\pm 1,71)

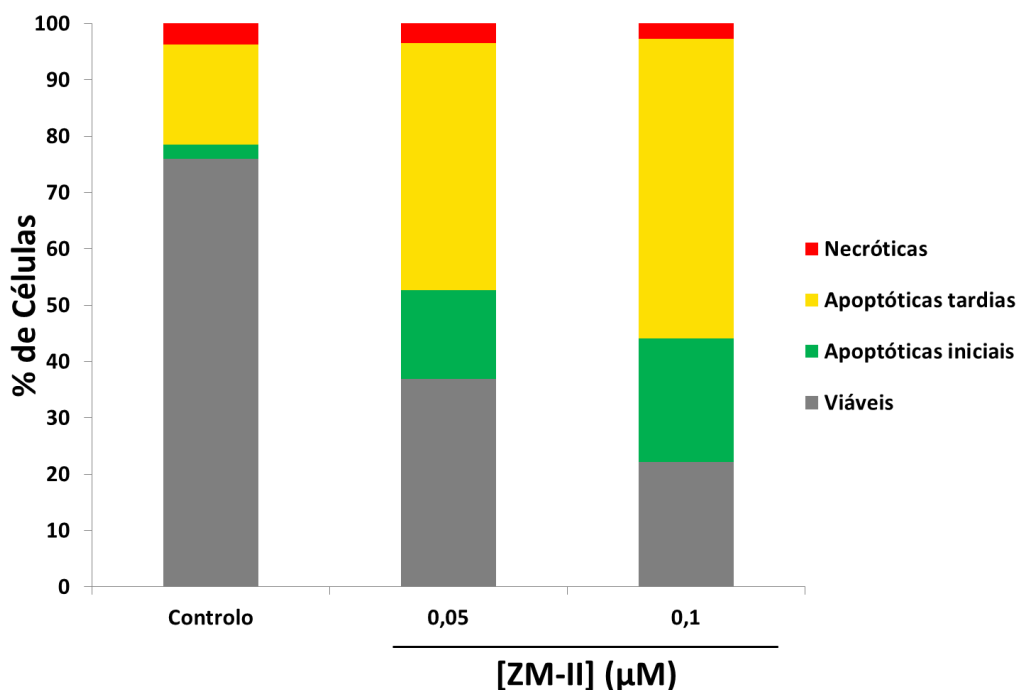


Figura 3.5 - Marcação dupla com Anexina V-FITC e IP para quantificação do nº de células em apoptose, inicial e tardia, e necrose, na ausência (controlo com 0,1 % (v/v) de DMSO) ou presença do composto ZM-II nas concentrações de 0,05 e 0,1 μ M, em células HCT116, por 48 horas. Os valores apresentados são referentes à média de três ensaios independentes.

Pela observação da Figura 3.5 constata-se que no controlo (DMSO) existem maioritariamente células viáveis (71,95%), isto é, sem qualquer marcação (FITC⁻/IP⁻). Relativamente, às células não viáveis a maioria encontram-se em apoptose tardia (17,74%), logo com marcação dupla (FITC⁺/IP⁺). Observa-se uma predominância da apoptose (20,37%) em relação à necrose (3,72%), estas células apresentam apenas marcação com o iodeto de propídeo (FITC⁻/IP⁺) (Figura 3.5). Por sua vez, nas células expostas às várias concentrações do composto ZM-II verifica-se a existência maioritária de células em apoptose tardia: 43,89 % para a concentração de 0,05 µM e 53,24 % para a concentração de 0,1 µM (Figura 3.5). Observa-se também uma predominância da apoptose em relação à necrose, sendo esta mais evidente nas células expostas às várias concentrações de composto em estudo. As células expostas a 0,05 µM apresentam 59,65% de células apoptóticas e 3,43% de células necróticas, por sua vez as células expostas a 0,1 µM apresentam 75,14% de células apoptóticas e 2,69% de células necróticas. Pode igualmente observar-se que a percentagem de células viáveis diminui com o aumento da concentração de ZM-II (36,92% para a concentração de 0,05 µM e 22,16% para a concentração de 0,1 µM) (Figura 3.5). Em termos de variação comparativamente ao controlo, verifica-se uma diminuição das células viáveis e um aumento das células apoptóticas totais em ambas as concentrações em estudo. Portanto, pela análise destes resultados é possível inferir que composto ZM-II promove a indução do processo apoptótico, tal como observado inicialmente pela marcação com a sonda de Hoechst 33258.

Os resultados obtidos estão de acordo com os resultados de viabilidade celular obtidos nos ensaios de avaliação de viabilidade celular. Assim, é possível afirmar que a perda de viabilidade poderá dever-se à indução da apoptose pela exposição das células tumorais ao composto ZM-II. Desta forma, pode-se concluir que o mecanismo pelo qual o composto ZM-II promove o seu efeito antiproliferativo é a indução do processo de apoptose.

3.3 Análise da Expressão de Genes Envolvidos Na Apoptose Através de RT-PCR

A fim de confirmar se a apoptose é o mecanismo molecular subjacente à capacidade antiproliferativa do composto ZM-II procedeu-se análise de alterações na expressão dos genes envolvidos no processo apoptótico. A avaliação da expressão destes genes foi realizada por RT-PCR.

3.3.1 Expressão de Genes Envolvidos na Apoptose

Procedeu-se à análise de alterações na expressão dos genes envolvidos no processo apoptótico, *BAX*, *BCL-2* e *CASP3* que codificam, para as proteínas Bax, Bcl-2 e caspase-3 respetivamente a partir de amostras de cDNA obtidas por transcrição reversa do RNA total extraído de células da linha tumoral HCT116 incubadas durante 3, 6, 9 e 12 h na presença de 0,05 μ M de composto ou de 0,1 % (v/v) de DMSO (controlo). As reacções de PCR foram realizadas usando *primers* específicos para a amplificação de cada um dos genes referidos (ver materiais e métodos secção 2.6.3). A avaliação da amplificação destes genes foi avaliada por eletroforese em gel de agarose dos produtos resultantes das reacções de PCR.

A quantificação da variação relativa da expressão dos genes utilizando o PCR em Tempo Real (qPCR) foi realizada através da utilização do método comparativo de *threshold* (Ct). Os resultados obtidos encontram-se na Figura 3.6.

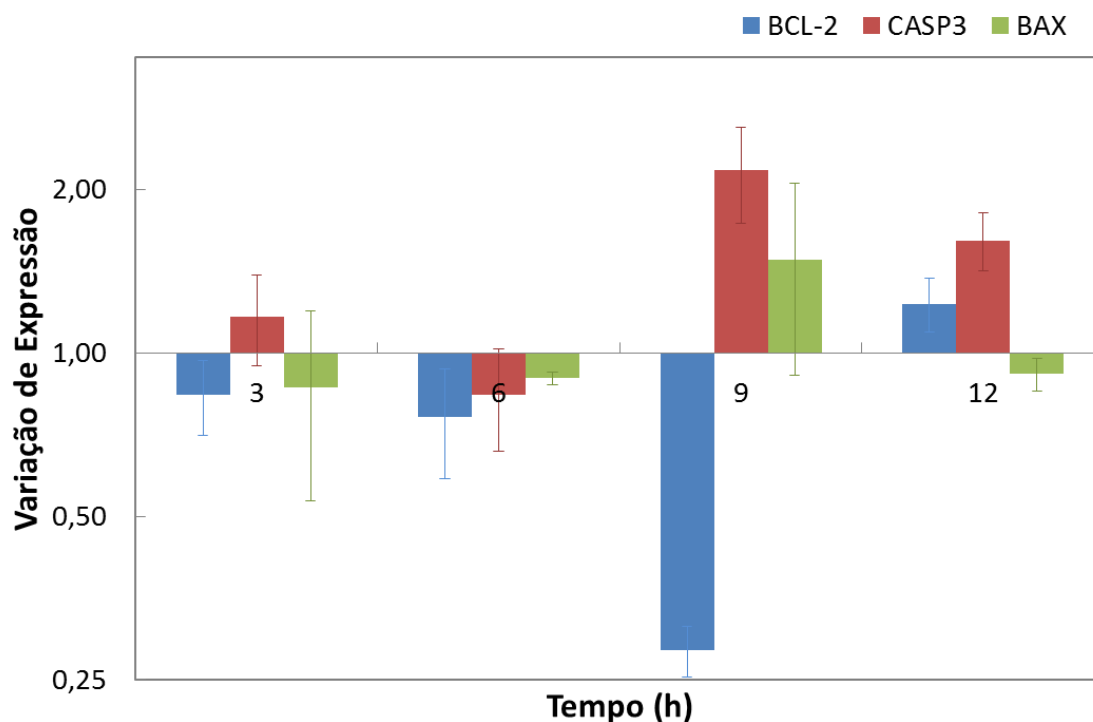
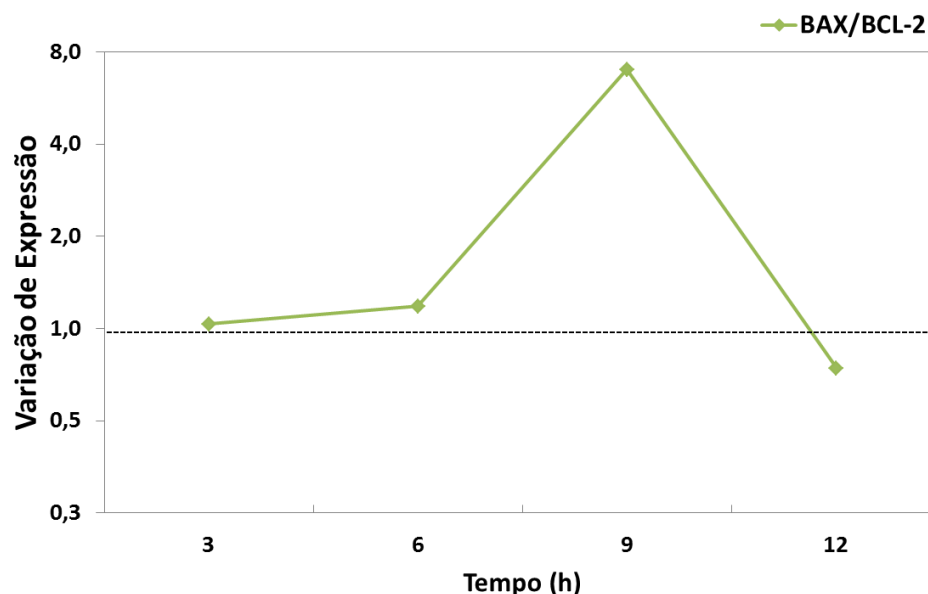


Figura 3.6 - Variação da expressão dos genes *BCL2*, *BAX* e *CASP3* em células HCT116 expostas a 0,05 μ M de ZM-II ou DMSO a 0,1 % (v/v) (controlo), por 48 horas. A quantificação foi realizada através da utilização do método comparativo de *threshold* (Ct). Os dados foram normalizados relativamente ao controlo interno (rRNA18SA). Os valores apresentados são referentes à média de três ensaios independentes.

A família de proteínas Bcl-2 regula a libertação do citocromo c nas mitocôndrias através da alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial. Esta família de proteínas pode ser dividida em dois grupos: as proteínas anti-apoptóticas, como a Bcl-2 e as proteínas pró-apoptóticas, como a Bax. Deste modo, estas proteínas regulam a via intrínseca do processo apoptótico, ou seja, as proteínas anti-apoptóticas bloqueiam a libertação do citocromo c e as proteínas pró-apoptóticas estimulam a sua libertação para o citoplasma. (Chipuk e Green, 2008; Elmore, 2007; Ghobrial *et al.*, 2005). A razão entre os níveis citoplasmáticos destas duas proteínas indica se a célula entra em apoptose por predominância de Bax relativamente à Bcl-2 (Elmore, 2007; Gonzalez *et al.*, 2001).

Através análise da variação relativa da expressão dos genes utilizando o PCR em tempo real realizada através do método comparativo de *threshold* (Ct) é possível observar que os níveis de expressão do gene *BCL-2* diminuem ligeiramente a partir das 3 h até às 6 h, diminuindo significativamente a partir das 6 h até as 9 h, e contrariamente os níveis de expressão aumentam significativamente a partir das 9 h até às 12 h de exposição do composto em relação ao controlo (Figura 3.6). Os níveis de expressão do gene *BAX* aumentam ligeiramente a partir das 3 h até às 6 h, aumento significativamente a partir das 6 h até as 9 h, pelo contrário os níveis de expressão diminuem significativamente a partir das 9 h até às 12 h de exposição do composto em relação ao controlo (Figura 3.6).

A partir dos valores de expressão do gene *BAX* e *BCL-2* é possível calcular a razão Bax/Bcl-2 que permite verificar se a célula desencadeou ou não o processo apoptótico. (Chen *et al.*, 1996). Desta forma, constata-se por observação da Figura 3.7 que os valores da razão Bax/Bcl-2 atingem um valor máximo (7) às 9 h de exposição de composto, existindo um aumento deste valor das 3 h (0,92) para as 6 h (1,18) e uma diminuição das 9 h para as 12 h (0,74). A partir destes resultados pode-se afirmar que composto apresenta a capacidade de induzir o processo apoptótico, uma vez que se verifica um aumento na expressão de Bax e uma diminuição da expressão de Bcl-2.



BCL-2/ BAX	1,03	1,18	7,00	0,74
------------	------	------	------	------

Figura 3.7 - Valores da razão Bax/Bcl-2 em células HCT116 expostas a 0,05 μ M de ZM-II ou DMSO a 0,1 % (v/v) (controlo), por 48 horas. Os valores apresentados são referentes à média de três ensaios independentes.

No processo apoptótico a clivagem da caspase-3 resulta na fragmentação de DNA, degradação de proteínas do citoesqueleto e nucleares, formação dos corpos apoptóticos e, por fim, o *uptake* por células fagocíticas (Elmore, 2007). Os níveis de expressão do gene *CASP3* apresentam uma pequena diminuição entre as 3 h e as 6 h, aumentam significativamente a partir das 6 h até as 9 h, contrariamente os níveis de expressão diminuem significativamente a partir das 9 h até às 12 h de exposição do composto em relação ao controlo. Desta forma, é possível inferir, tal como anteriormente, que o composto apresenta a capacidade de induzir o processo apoptótico. De forma global, os resultados obtidos indicam que o processo apoptótico é iniciado a partir das 6 h de incubação do composto ZM-II, verificando-se maior expressão de *BAX* em relação à *BCL-2*. O processo apoptótico ocorre entre as 6 e as 9 h, já que se verifica elevada expressão de *CASP3*. No entanto, a partir das 9 h observa-se uma retroceder do processo apoptótico, uma vez que há uma maior expressão de *BCL-2* e menor expressão de *BAX*, e também diminuição da expressão de *CASP3*. Este fato pode ser explicado, uma vez que o composto poderá ter uma ação rápida perante as células, o que leva a que o processo apoptótico ocorra de forma rápida. Assim, pode-se deduzir que o composto apresenta a capacidade de desencadear o processo apoptótico, uma vez que se registou o

aumento da expressão de genes responsáveis por alterações bioquímicas e morfológicas características deste mecanismo de morte celular.

Assim, por três metodologias independentes foi possível confirmar que a apoptose é um dos mecanismos moleculares subjacente à capacidade antiproliferativa do composto ZM-II (pontos 3.2.1 e 3.2.2). Com base em estudos anteriores que afirmam que a via intrínseca é a principal via de atuação dos compostos anti-tumorais pode ser provável que a via intrínseca seja a via da apoptose pela qual o composto em estudo desencadeia o processo apoptótico. No entanto, seria necessário estudos posteriores que permitam concluir esta afirmação, tais como o estudo de alterações na expressão de genes envolvido apenas na via intrínseca do processo apoptótico como a Caspase-9.

3.4 Progressão Do Ciclo Celular

O ciclo celular está dividido em quatro fases sequenciais: G1, S, G2 e M. Durante a fase G1 as células encontram-se metabolicamente ativas e crescem continuamente, sem replicarem o seu conteúdo em DNA. Na fase S ocorre a síntese ou replicação do DNA, assim as células duplicam o seu conteúdo de DNA, continuando, no entanto com o mesmo número de cromossomas. Durante a fase G2 as células preparam-se para entrar em mitose. A fase M inicia com a divisão nuclear, que corresponde à separação dos cromossomas, e termina com a divisão citoplasmática. Por fim, existe também uma quinta fase, G0 ou fase de quiescência, na qual as células podem reversivelmente sair de G1 e entrar nesta fase, onde as células permanecem metabolicamente ativas mas não proliferam (Kastan, 2004; Garret, 2001).

A fim de verificar se o composto ZM-II interfere no ciclo celular procedeu-se à análise da progressão do ciclo celular por citometria de fluxo. Para tal, as células HCT116 foram sincronizadas por um duplo bloqueio com timina, de forma a ficarem retidas no início da fase S. Posteriormente, as células foram incubadas com 0,05 μ M de composto em estudo ou 0,1 % de DMSO (controlo), por períodos de 8 h e 24 h. As amostras foram tratadas através do programa de Attune® Cytometric Software v2.1. Os histogramas resultantes encontram-se na Figura 3.8 e os gráficos resultantes da análise dos histogramas encontram-se na Figura 3.9.

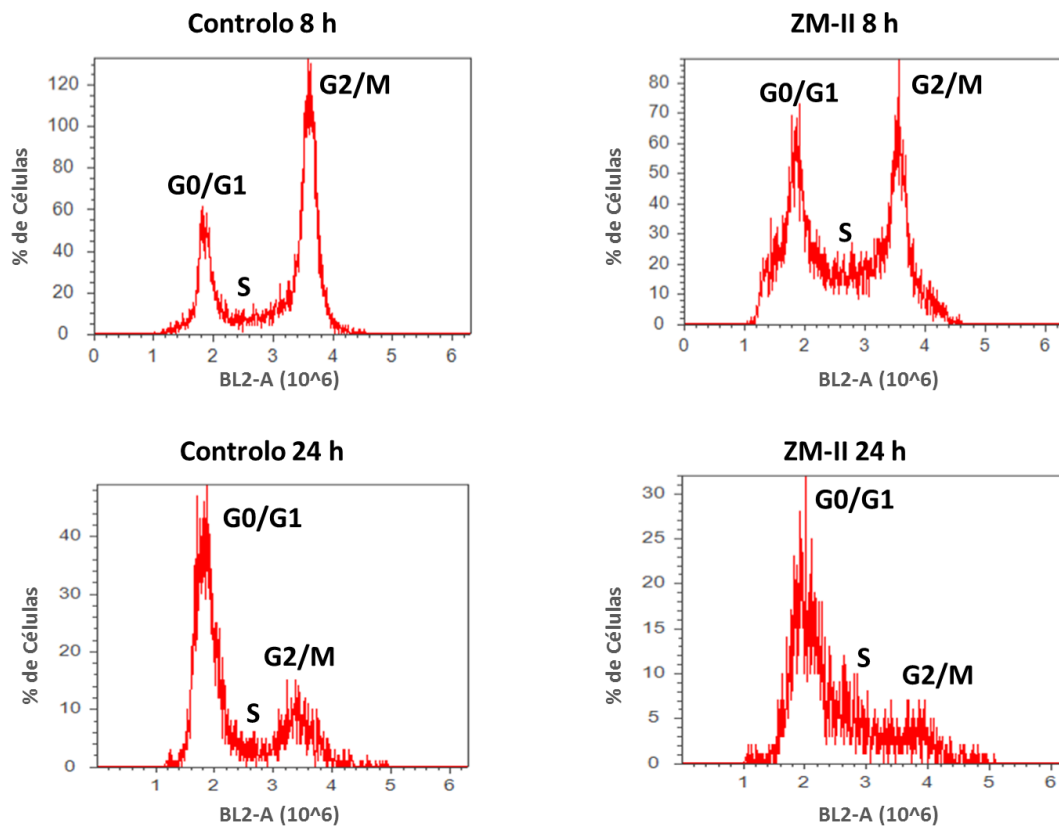


Figura 3.8 - Distribuição das células pelas diferentes fases do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M). As células HCT116 foram sujeitas a um duplo bloqueio com Timidina 2 mM e, posteriormente, expostas a 0.1 % (v/v) de DMSO ou 0,05 μ M de composto, por períodos de 8 h e 24 h. As amostras foram analisadas por ensaio de citometria de fluxo e tratadas através do programa Attune® Cytometric Software v2.1. Os histogramas são representativos de três ensaios independentes.

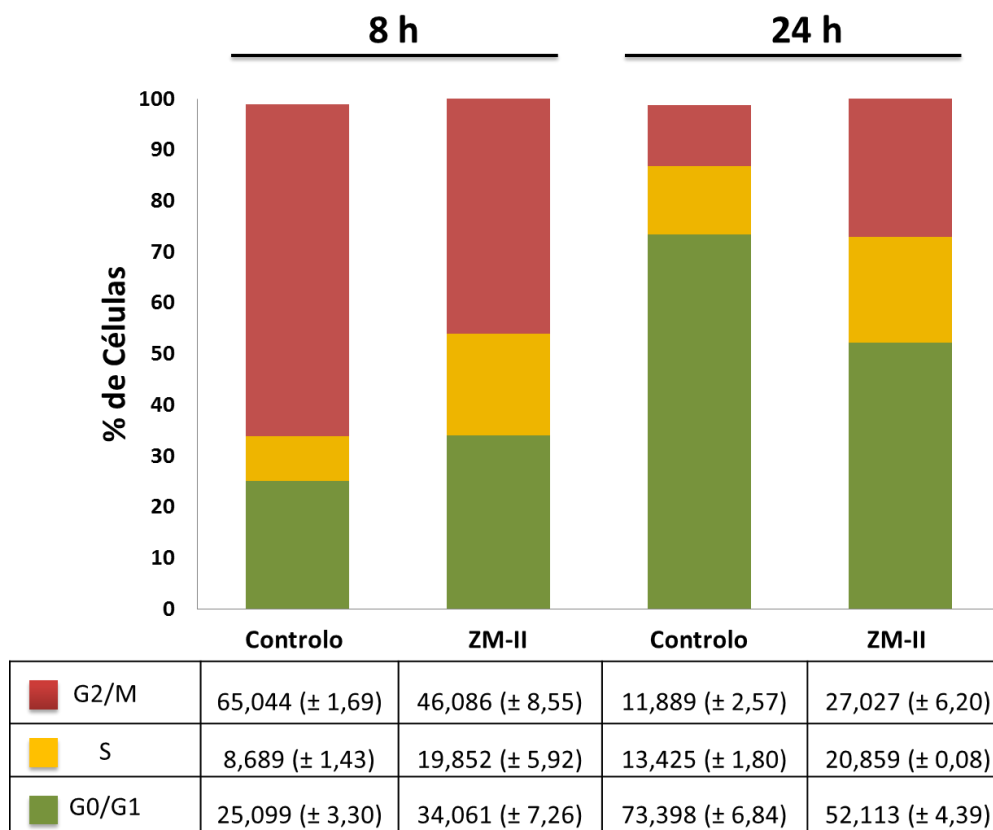


Figura 3.9 - Percentagem de células nas fases G0/G1, S e G2/M, na presença do composto ZM-II na concentração de 0,05 μM ou na ausência do mesmo (controlo com 0.1% (v/v) de DMSO), em células HCT116, por 8 h e 24 h. Os valores apresentados são referentes à média de três ensaios independentes.

Verifica-se que as células do controlo incubadas durante 8 h com DMSO encontram-se maioritariamente em G2/M (65,044 %), algumas em G0/G1 (25,099 %) e uma pequena percentagem em S (8,689 %) (Figura 3.7). As células incubadas durante 24 h com DMSO encontram-se maioritariamente em G0/G1 (73,398 %), e uma pequena parte em S (13,426 %) e em G2/M (Figura 3.9). Este resultado demonstra que ao longo das 24 h houve uma progressão do ciclo celular. Das células expostas ao composto durante 8 h, 46,086% encontram-se em fase G2/M, 34,061% em G0/G1 e 19,852% em fase S (Figura 3.9) Comparativamente com as células controlo em igual período de tempo (8 h) observa-se um ligeiro aumento de células nas fases S e G0/M e uma redução de células em G2/M, o que indica que o composto pode induzir um ligeiro retardamento na progressão do ciclo celular em G0/G1 (Figura 3.9). Contudo, as células expostas ao composto durante 24 h encontram-se maioritariamente em G0/G1 (52,113 %), e uma parte em G2/M (27,027 %) e em S (20,859 %). Comparando com as células controlo das 24 h verifica-se uma redução de células G2/M, um aumento de células em G0/G1 e ligeiro aumento de células em S. O que indica, igualmente, que o composto pode induzir um ligeiro retardamento na progressão do ciclo celular em G2/M.

Ao comparar as células expostas ao composto durante 8 h com as 24 h é possível verificar um aumento de células em G0/G1, e uma redução de células em G2/M e em S, o que permite concluir que há um retardamento na progressão do ciclo celular com o aumento do tempo de incubação com o composto em estudo. Assim, é possível concluir que o composto ZM-II pode interferir no ciclo celular, provocando um retardamento na progressão do ciclo celular em G0/G1.

Segundo Teyssot e colaboradores (2009) verificou-se que os compostos de cobre apresentam a capacidade de induzir à paragem da progressão do ciclo celular na fase G1 a concentrações dez vezes mais baixas do que a cisplatina, bem como induzir um retardamento na progressão do ciclo celular na fase G2.

3.5 Estudos de Interação do compostos ZM-II com o DNA

Para a caracterização de novos compostos com propriedades anti-tumorais é essencial a avaliação da sua interação com a molécula de DNA (Palchaudhuri e Hergenrother, 2007). A fim de avaliar a interação do composto ZM-II com a molécula de DNA foram realizados vários ensaios *in vitro*, incluindo a espectroscopia de absorção e ensaios de retardamento da mobilidade electroforética. O DNA é principal alvo intracelular primário de muitos compostos anti-tumorais, desta forma é relevante o estudo da interação do composto em estudo com a molécula de DNA (Bartel *et al.*, 2012; Desoize, 2004, Onoa e Moreno, 2002).

3.5.1 Espectroscopia de Absorção

A espectroscopia de absorção é um método eficaz no estudo da interação de um composto e a molécula de DNA (Gallego *et al.*, 2011; Shahabadi *et al.*, 2011). Esta técnica permite determinar o mecanismo de ação do composto em relação à molécula de DNA (Liao *et al.*, 2005). Desta forma, com o objetivo de determinar possíveis interações entre o composto ZM-II e a molécula de DNA foram realizados ensaios de espectroscopia de absorção. Os espectros resultantes encontram-se na Figura 3.10.

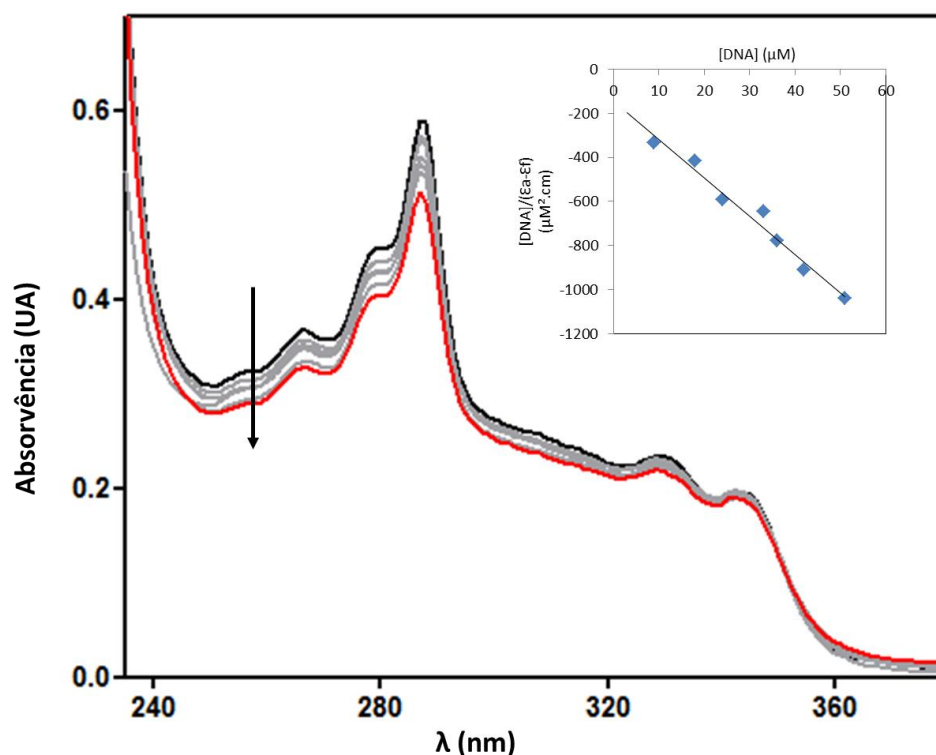


Figura 3.10 - Variação da absorvância do composto ZM-II ($5 \mu\text{M}$) na região do UV, na ausência (linha a preto) e na presença de concentrações crescentes de CT-DNA (maior concentração de DNA representada pela linha vermelha), em tampão 5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7. Encontra-se também representada, no canto superior direito, a regressão linear que permite determinar o valor da constante de afinidade para o DNA (K_b). A seta indica a variação da absorvância com o aumento da concentração de DNA (0 a $27 \mu\text{M}$). Os espectros são representativos de várias experiências independentes.

Através da visualização do gráfico é possível verificar uma diminuição nos valores de absorvância nos espectros de espectroscopia de absorção do composto, visível aos 287 nm, valor de absorvância correspondente ao comprimento de onda no qual se verifica o máximo de absorvância para o composto. Desta forma, observa-se a existência de hipocromismo, que consiste no decréscimo na absorção molar, e a ausência de desvio batocrómico, que consiste na alteração do máximo de absorvância. Ao verificar-se a existência de hipocromismo e batocromismo pode-se afirmar que o modo de interação poderá ocorrer por intercalação (Shahabadi *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2003). Assim, com base nesta afirmação, pode-se inferir que o composto em estudo não deverá estar envolvido num mecanismo por intercalação, uma vez que apenas se verificou a existência de hipocromismo.

Através do cálculo da constante de afinidade para o DNA (K_b) foi possível determinar a intensidade de ligação do composto. Para o cálculo da constante de ligação utilizou-se a curva $[\text{DNA}] / (\epsilon a - \epsilon f)$ versus $[\text{DNA}]$ representada na Figura 3.10. Assim, o valor de K_b obtido para o

composto ZM-II foi de $1,73 (\pm 0,7) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, o que mostra que o composto apresenta afinidade para a molécula de DNA, podendo interagir com a mesma. Ao comparar o valor de K_b obtido com o valor de K_b da doxorubicina (DOX), $3,48 (\pm 0,04) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (Luís, 2011), verifica-se que todas as constantes de afinidade encontram-se na mesma ordem de grandeza. A partir deste resultado pode-se inferir que o composto em estudo apresenta afinidade de ligação ao DNA ligeiramente inferior à da DOX.

3.5.2. Ensaio de Retardamento da Mobilidade Electroforética (EMSA)

A partir dos resultados obtidos no ensaio de espectroscopia de absorção foi possível inferir a existência de interação entre o composto ZM-II e a molécula de DNA. Assim, com o objetivo de determinar o mecanismo pelo qual o composto efetua esta interação, efetuou-se o ensaio de EMSA. Este ensaio permite estudar as alterações conformacionais da forma superenrolada na molécula de DNA plasmídico (Keck e Lippard, 1992). O DNA plasmídico apresenta três formas estruturais: a superenrolada (Forma I), a circular relaxada (Forma II) e a linear (Forma III) (Horn, 2005).

A avaliação da interação entre o composto ZM-II e o DNA plasmídico pBSKII (2961 pb) foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 0,7 % (p/v), com o intuito de observar potenciais alterações nas bandas electroforéticas correspondentes às três formas estruturais de DNA plasmídico. A Figura 3.11 mostra o resultado da incubação do composto com o DNA plasmídico (pBSKII) em tampão 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7,25, por um período de 24 horas.

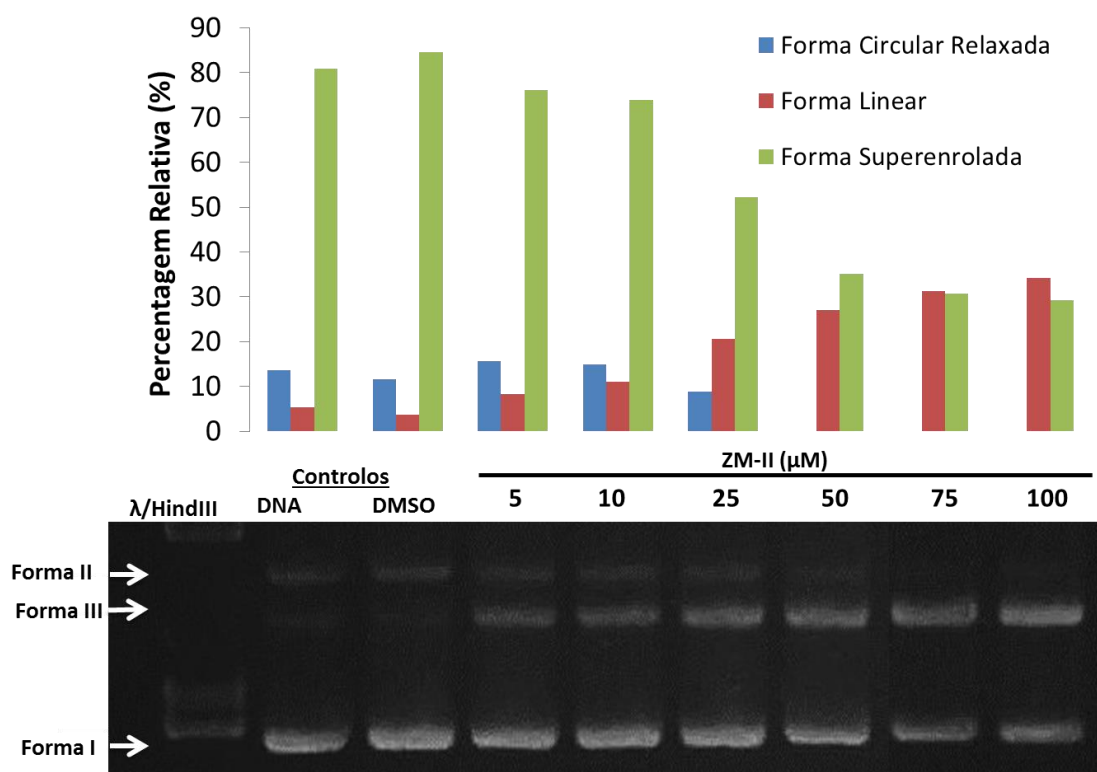


Figura 3.11 - Eletroforese em gel de agarose a 0,7 % (p/v) dos produtos resultantes da incubação do composto ZM-II em concentrações crescentes (5 a 100 µM) e DNA plasmídico pBSKII. λ /HindIII – marcador de pesos moleculares; C – controlo com DNA plasmídico pBSKII; C_{DMSO} – controlo com DMSO a 1 % (v/v) na ausência do composto. Gráfico de barras mostra distribuição das três conformações do pDNA (superenrolada (Forma I), circular relaxada (Forma II) e a linear (Forma III)) em percentagem, obtida através da análise densitométrica do gel através do programa GelAnalyzer. A imagem do gel é representativa de várias experiências independentes.

Na presença de concentrações crescentes de compostos ZM-II observa-se uma diminuição da percentagem da forma superenrolada (Forma I) e da forma circular relaxada (Forma II) e por outro lado observa-se aumento da percentagem da forma linear (Forma III) (Figura 3.11). Desta forma, pode-se inferir que o composto apresenta a capacidade de induzir quebras em cadeia dupla (interagindo diretamente com a Forma I e II do DNA plasmídico). Caso o composto apresentasse a capacidade de induzir quebras em cadeia simples, primeiro ocorreria o aumento da Forma II, resultante do único corte sobre a Forma I, e só depois esta seria convertida na Forma III, após a ocorrência de um segundo corte na proximidade do primeiro (Mancin e Tecilla, 2009). No entanto, como não se verifica um aumento da Forma II e como não houve desaparecimento completo da Forma I, pode afirmar-se que se verifica então a transformação direta da Forma I para a Forma III (corte em cadeia dupla). Este efeito é bem visível a partir da concentração de 25 µM. Relativamente ao controlo contendo 1,5 % (v/v) de DMSO, não se observa qualquer alteração nas bandas electroforéticas correspondentes às três formas de DNA plasmídico.

3.5.2 EMSA na Dependência do Tempo

Com o intuito de proceder a uma melhor análise da interação entre o composto ZM-II e o DNA plasmídico procedeu-se à incubação do pDNA na presença de 10 e 50 μM de composto ZM-II ao longo do tempo.

A avaliação da interação entre o composto ZM-II e o DNA plasmídico pBSKII (2961 pb) dependente do tempo foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 0,7 % (p/v), no qual o DNA pBSKII foi incubado a diferentes tempos 1, 5, 20, 24 e 48 h, a 37 °C, com o composto nas concentrações de 10 e 50 μM , e o controlo de DMSO foi apenas incubado por 48 h. O gel de agarose representativo e a sua análise, efetuada por densitometria utilizando *software GelAnalyzer*, encontra-se na Figura 3.12.

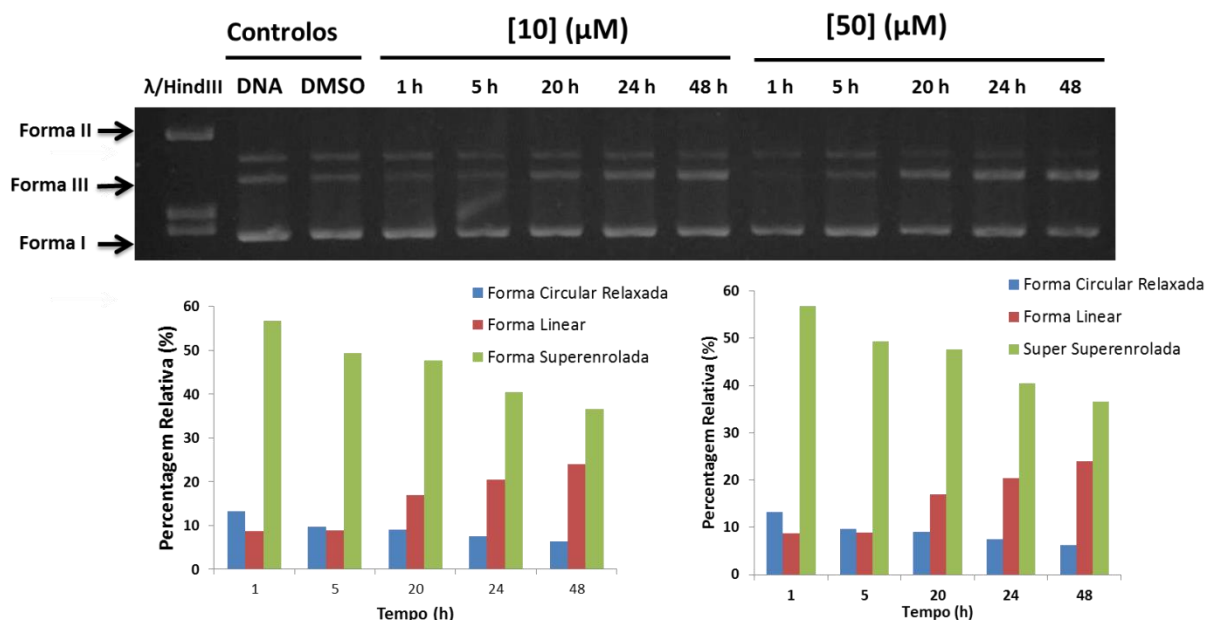


Figura 3.12: Eletroforese em gel de agarose a 0,7 % (p/v) dos produtos resultantes da incubação do composto ZM-II e o DNA plasmídico pBSKII, dependente do tempo (1 a 48 h). λ/HindIII – marcador de pesos moleculares; C – controlo com DNA plasmídico pBSKII; C_{DMSO} – controlo com DMSO a 1 % (v/v) na ausência do composto. Gráfico de linhas mostra a distribuição das três conformações do pDNA (superenrolada (Forma I), circular relaxada (Forma II) e a linear (Forma III)) dependente do tempo, em percentagem, obtida através da análise densitométrica do gel através do programa GelAnalyzer. A imagem do gel é representativa de várias experiências independentes.

A partir da Figura 3.12 é possível observar a diminuição da percentagem das Formas I e II e o aumento da percentagem da Forma III, com o aumento do tempo de incubação nas duas concentrações de composto estudadas. Estes resultados permitem verificar que, de fato, o

composto em estudo apresenta a capacidade de introduzir quebras na cadeia dupla do DNA, como observado anteriormente (Figura 3.11).

3.6 Detecção de quebras no DNA – Eletroforese em gel de célula única ou Ensaio Comet

Com o intuito de quantificar a quantidade de DNA fragmentado, resultante de quebras na molécula de DNA, procedeu-se à realização do ensaio *Comet*. Este ensaio permite a identificação de quebras no DNA quer em cadeia simples quer em cadeia dupla (Colins *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 1998). Deste modo, a aplicação deste ensaio baseia-se no conhecimento previamente adquirido a partir dos ensaios de espectroscopia de absorção e EMSA (3.5.1 e 3.5.2, respetivamente), de que o composto apresenta a capacidade de interagir *in vitro* com a molécula de DNA. Portanto, este ensaio permite analisar se o composto interage com o DNA num ambiente celular.

As células da linha HCT116 foram incubadas durante 24h, na presença do composto ZM-II a 0,05 e 0,1 μM , 0.1 % de DMSO (controlo negativo), e foi preparado outro controlo negativo sem a adição de DMSO. Foi também preparado um controlo positivo, no qual as células HCT116 foram expostas durante 30 minutos a 0,05 % (v/v) de peróxido de hidrogénio.

As lâminas foram visualizadas num microscópio de fluorescência (Leica DFC 480) recorrendo ao programa Optika Vision Pro (Optika, Itália) para aquisição das imagens. Posteriormente, as imagens foram analisadas no programa *CometScore* (Tritek). Na Figura 3.13 pode observar-se duas imagens representativas do controlo negativo e de células incubadas durante 24 h na presença de 0,1 μM ZM-II.

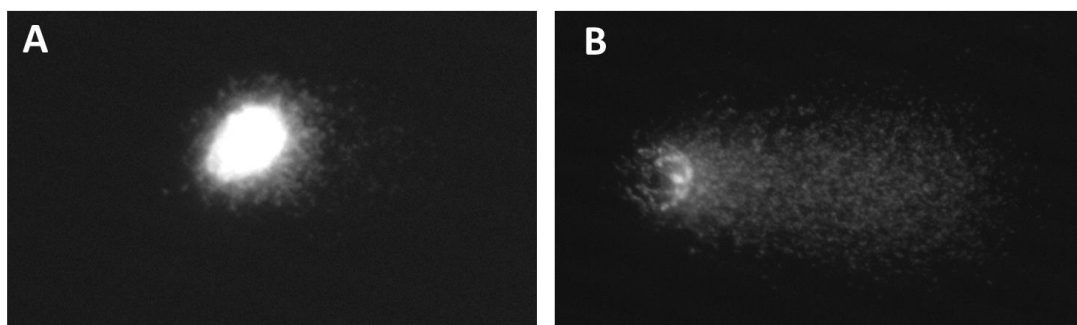


Figura 3.13 - Células HCT116 analisados por ensaio *Comet*. A) Núcleo de uma células HCT116 controlo negativo (sem adição do composto ZM-II ou DMSO), consistem numa cabeça com mínima ou nenhuma migração de DNA na região da cauda. B) Núcleo de uma células HCT116 exposta a 0,1 μM de composto ZM-II durante 24h a 37°C, consiste num cabeça com migração do DNA para a região da cauda, como resultado de quebras simples ou duplas na molécula de DNA.

Os resultados obtidos encontram-se representados na Tabela 3.2 e na Figura 3.14. Os cometas podem ser classificados em 5 classes distintas, consoante a sua morfologia e grau de danos na cauda do cometa: [0; 20[, [20;40[, [40;60[, [60;80[, [80;100] % de DNA na cauda. Assim, através da análise do figura 3.15 observa-se que no controlo (sem adição de DMSO) observa-se uma predominância de células com [0-20[e]20-40[% de DNA na cauda, 46,4 % e 43,3 %, respetivamente. Assim, verifica-se que a maioria das células não expostas a composto a ZM-II ou a DMSO apresentam poucos danos no DNA. Relativamente, às células expostas ao DMSO observa-se que 43,5 % das células apresentam [0-20[% de DNA na cauda, 30,3 % apresenta [20-40[% de DNA na cauda, 17,8 % apresenta [40-60[% de DNA na cauda, 4,9% de apresentam [60-80[% de DNA na cauda (4,9 %) e 3,5 % apresentam [80-100[% de DNA na cauda. O que demonstra que o DMSO apresenta a capacidade de provocar danos no DNA comparativamente com o controlo. Em relação, as células expostas ao H₂O₂ (controlo positivo) observa-se que 24,9 % das células apresentam [0-20[% de DNA na cauda, 32,6 % apresentam [20-40[% de DNA na cauda, 21,7% apresentam [40-60[% de DNA na cauda e 17,7 % apresentam [60-80[% de DNA na cauda e apenas 3,1 % apresentam [80-100[% de DNA na cauda. Estes resultados demonstram que, tal como esperado, o H₂O₂ apresentam a capacidade de provocar elevados danos na molécula de DNA. Por sua vez, nas células expostas a 0,05 µM de composto ZM-II observa-se que 54,2 % de células apresentam]0-20[% de DNA na cauda, 32,6 apresentam [20-40[% de DNA na cauda e 6,8% apresentam [40-60[% de DNA na cauda, 4,0 % apresentam [60-80[% de DNA na cauda e 2,5 % apresentam [80-100[% de DNA na cauda. Nas células expostas a 0.1 µM de composto observa-se que 27,8 % de células apresentam [0-20[% de DNA na cauda, 41,7 % de células apresentam [20-40[% de DNA na cauda, 20,7 % apresentam [40-60[% de DNA na cauda, 5,6 % apresentam [60-80[% de DNA na cauda e 4,4% [80-100[% de DNA na cauda. A esta concentração de compostos os resultados são semelhantes ao controlo positivo, o que sugere que o composto nesta concentração provoca mais danos na molécula de DNA. Assim, é possível inferir que o composto ZM-II induz quebras na molécula de DNA com o aumento da concentração do composto. Porém, seria de esperar, tenha em conta os resultados de interação de DNA (3.3), uma percentagem de danos superior à obtida. É também possível verificar que as células expostas ao DMSO e as células expostas à concentração de 0,05 µM de composto ZM-II apresentam resultados semelhantes, o que sugere que esta concentração de composto é demasiado baixa para provocar danos na molécula de DNA, tal como observado na concentração de 0,1 µM de composto.

Tabela 3.2 - Valores obtidos, pelo Ensaio *Comet*, de % de DNA na cauda para cada uma das condições estudadas: controlo, % (v/v) DMSO, % (v/v) H₂O₂, e na presença de composto a 0,05 e 0,1 µM, em células HCT116. Os valores são representativos de três experiências independentes e a desvio padrão são em relação à média.

	Controlo	DMSO	H ₂ O ₂	0,05	0,1
Média	23,0	27,4	38,3	24,2	31,8
Desvio Padrão	1,1	8,8	8,8	13,1	8,6
[0-20[46,5	44,5	24,9	51,0	27,8
[20-40[43,4	30,9	32,6	35,3	41,5
[40-60[9,3	18,1	21,7	7,3	20,7
[60-80[0,3	5,0	17,7	3,7	5,6
[80-100]	0,3	1,4	3,1	2,7	4,4

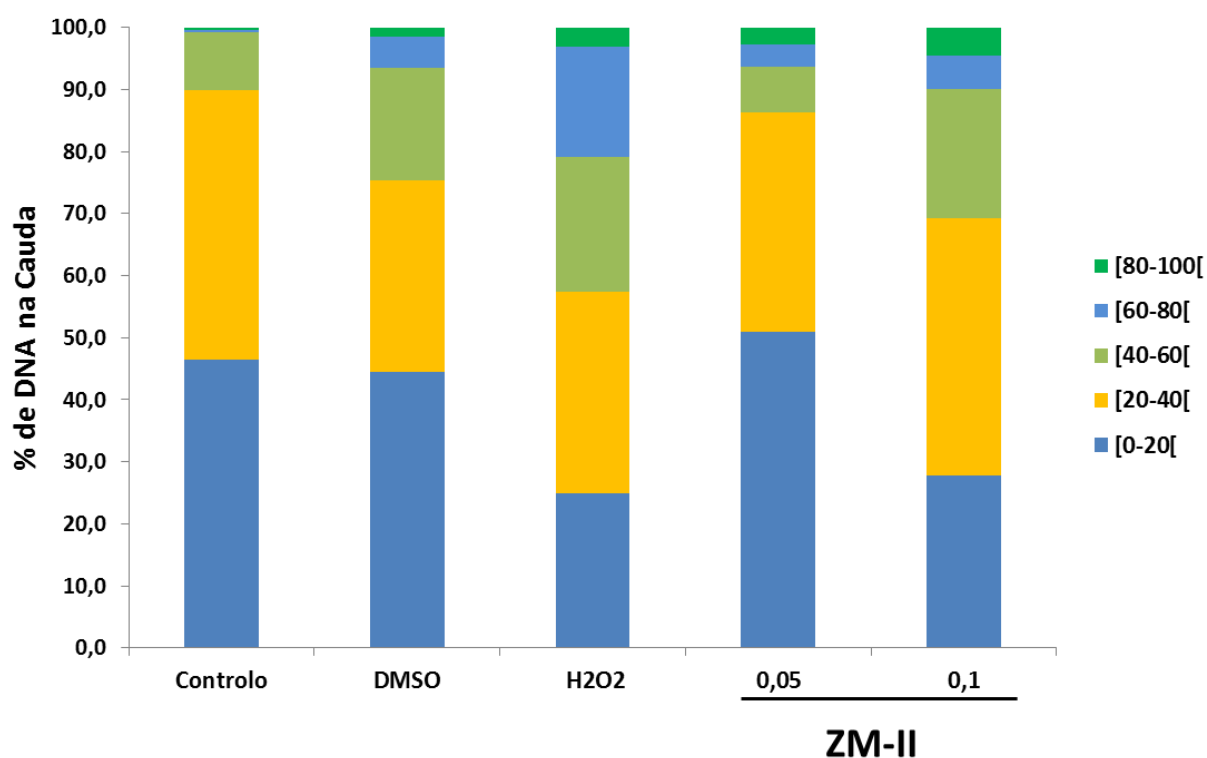


Figura 3.14 - Ensaio *Comet* para quantificação do níveis de DNA na cauda, na presença do composto ZM-II a 0,05 e 0,1 µM, 0,1 % de DMSO, sem composto e DMSO e 0,05 % (v/v) de H₂O₂, em HCT116. A quantificação foi feita no programa *CometScore* (Tritek).

Relativamente, às médias da percentagem de DNA nas caudas (Figura 3.15) verifica-se que as células que não foram expostas ao DMSO apresentam em média 22,99 % de DNA na cauda, as células expostas ao DMSO apresentam em média 33,90 % de DNA na cauda, as células expostas ao H₂O₂ apresentam em média 42,03 % de DNA na cauda, as células expostas

a 0,05 μM de composto apresentam em média 32,23 % de DNA na cauda e as células expostas a 0,1 μM de composto apresentam em média 36,96 % de DNA na cauda. Este resultados sugerem que, tal como demonstrado anteriormente, o composto ZM-II apresenta a capacidade de introduzir quebras na molécula de DNA com o aumento da concentração do mesmo.

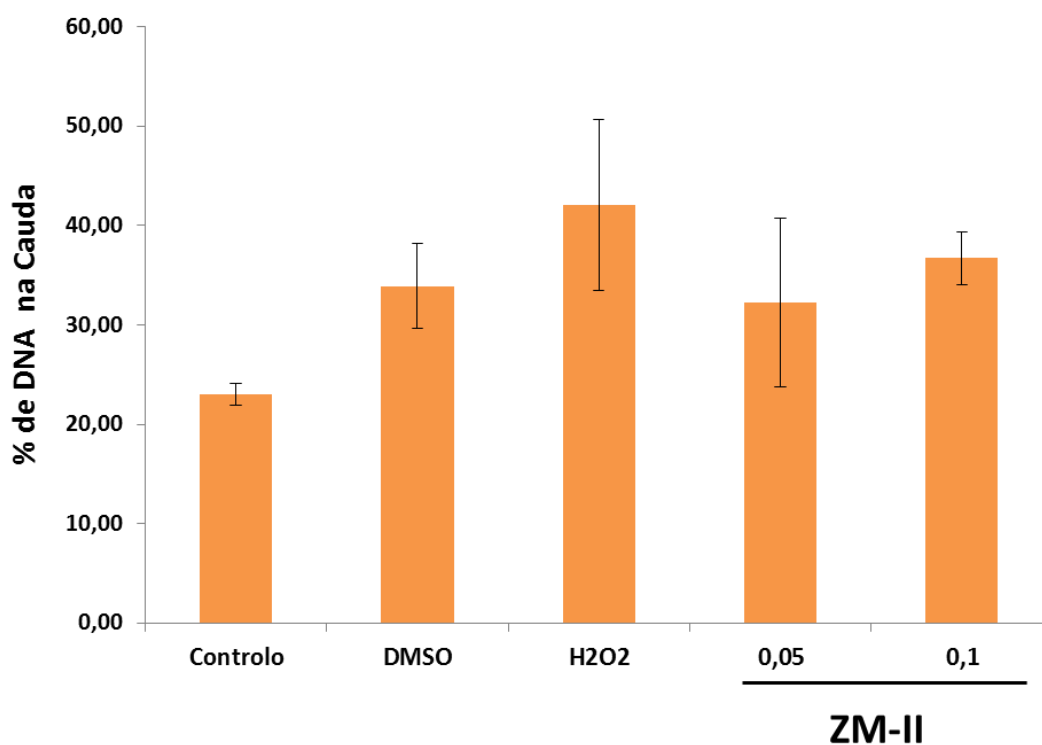


Figura 3.15 - Representação gráfica da média da percentagem de DNA na cauda para cada uma das condições estudadas: controlo, % (v/v) DMSO, % (v/v) H2O2, e na presença de composto a 0,05 e 0,1 μM , em células HCT116. O gráfico é representativo de três experiências independentes e a barras de erro correspondem ao desvio padrão em relação à média.

Pensa-se que os danos observados na molécula de DNA sejam provocados por formação de ROS, tendo em conta a capacidade de cobre para produzir grandes quantidades de ROS (Iakovidis *et al.*, 2011).

Com o intuito de determinar se o mecanismo de clivagem do DNA, promovida pela presença do composto ZM-II, ocorre através de uma via oxidativa ou hidrolítica, é importante realizar ensaios, tais como o ensaios de interação com agentes redutores, como por exemplo, o DMSO, azida de sódio, ácido ascórbico, glicerol, manitol, catálase ou peróxido de hidrogénio. A partir destes ensaios seria possível confirmar se o mecanismo de clivagem de DNA, promovida pela presença do composto em estudo, ocorre devido à presença de ROS, tais

como os radicais hidroxílos ou superóxidos. Ou se caso contrário, a clivagem do DNA deve-se a uma quebra hidrolítica na molécula de DNA (Ju *et al.*, 2006)

3.7 Análise de Proteómica

Com o intuito de identificar potenciais alvos biológicos do composto ZM-II procedeu-se ao estudo proteoma de células HCT116 expostas ou não a uma concentração de 0,08 μ M ZM-II durante 24 h. Os extratos proteicos foram sujeito a uma eletroforese 2-DE, obtendo-se no total 6 géis bidimensionais, correspondendo a triplicados do proteoma na presença de composto ZM-II ou na ausência (0,15% DMSO). A análise quantitativa da variação da expressão dos *spots* proteicos realizou-se utilizando o programa Melanie 7.0. A análise estatística foi complementada pela utilização do programa *GraphPad*, tendo-se apenas considerado os *spots* proteicos com *p*-value menor que 0,05.

Foi considerado como alteração biologicamente significativa quando a expressão relativa para o composto ZM-II relativamente ao controlo (ZM-II/controlo), foi superior a 1,5 (sobre-expressão) e inferior a 0,7 (sub-expressão). Desta forma, observou-se que de entre os 130 *spots* proteicos detetados nos géis 2-DE realizados neste trabalho, 33 *spots* proteicos apresentavam variação significativa da expressão (Figura 3.16).

De forma a identificar proteínas cuja expressão variou significativamente na presença de ZM-II, procedeu-se à sua identificação por MALDI – TOF Mass spectroscopy. Desta forma, foi possível a identificação de 18 proteínas com expressão alterada na presença de ZM-II relativamente à condição controlo. Na Figura 3.16 encontra-se a imagem dos géis 2D representativos do proteoma da linha tumoral HCT116 na presença ou na ausência de composto, identificando-se as proteínas que apresentam maiores variação de expressão proteica em relação ao controlo. Os valores numéricos dos níveis de expressão, a informação complementar de cada proteína identificada, assim como o nome da proteína, a abreviatura e a massa molecular (Mm) e ponto isoelétrico (PI) estão apresentados na Tabela 3.3.

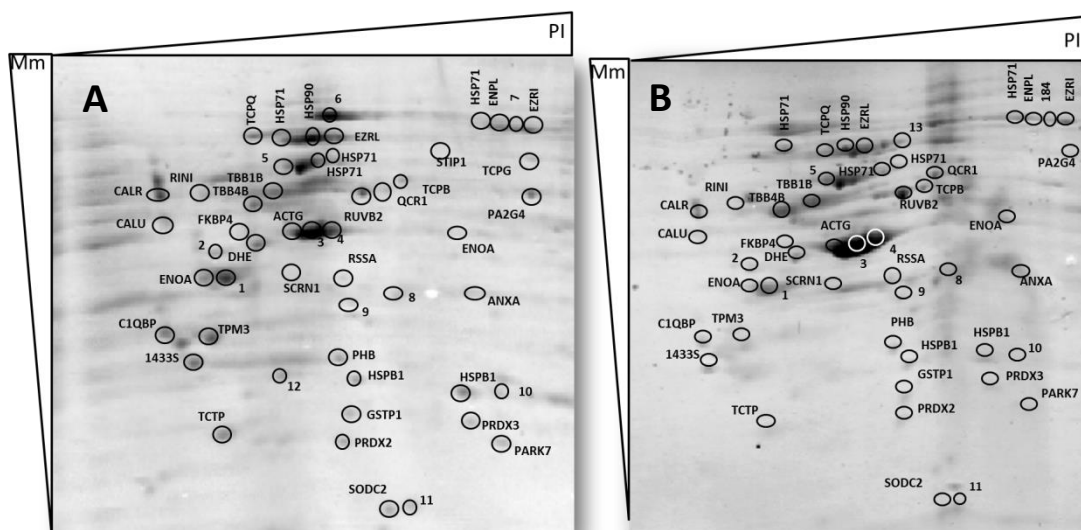


Figura 3.16: Imagem dos géis bidimensionais do proteoma da linha tumoral HCT116 tratada durante 24 h com 0,15 % (v/v) de DMSO (controle) (A), e 0,08 μ M de ZM-II (B) corados com azul de Comassie Coloidal R350. Os *spots* assinalados representam as proteínas identificadas com a respectiva abreviatura do nome.

De uma forma global foi observado que 18 proteínas com expressão significativamente alterada estão envolvidas na resposta ao *stress* oxidativo, no processo apoptótico, na manutenção do citoesqueleto e na progressão/paragem do ciclo celular (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 - Proteínas identificadas nos géis obtidos por eletroforese bidimensional com o respectivo ponto isoeléctrico (pI), massa molecular (Mm), expressão relativa para o composto ZM-II (em relação aos respectivo controlo). Os valores correspondem à média de três ensaios independentes. Valores inferiores a 0,7 foram considerados sub-expressão e valores superiores a 1,5 referem-se a sobre-expressão.

Proteína	Abreviatura	pI	Mm (Da)	Variação de expressão ZM-II
<i>Tubulin beta-4B chain</i>	TBB4B	4,79	49799	3,83
<i>Tubulin alpha-1B chain</i>	TBA1B	4,94	50119,6	1,51
<i>Translationally-controlled tumor protein</i>	TCTP	4,84	19582,6	1,79
<i>T-complex protein 1 subunit beta</i>	TCTB	6,01	57452,1	2,42
<i>Ezrin</i>	EZRL	5,94	69369,7	2,95
<i>Peroxiredoxin-2</i>	PRDX2	5,66	21878,2	1,78
<i>Heat shock protein beta-1</i>	HSPB1	5,98	22768,5	1,77
<i>Heat shock 70 kDa protein 1A/1B</i>	HSP71	5,48	70009	4,31
<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	HSP90B	4,97	83,2121	3,11
<i>Calreticulin</i>	CALR	4,29	48111,8	1,92
<i>14-3-3 protein sigma</i>	1433S	4,68	27756,7	1,54
<i>Annexin A1</i>	ANXA1	6,57	38690	1,78
<i>Secemin-1</i>	SRCN1	4,66	46,3525	1,54
<i>Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial</i>	GLUD1	7,66	61359,2	1,72
<i>Alpha-enolase</i>	ENOA	7,01	47139,3	0,24
<i>Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial</i>	C1QBP	4,74	31342,6	1,84
<i>RuB-like2</i>	RUVB2	5,49	51,1246	1,72
<i>Calumenin</i>	CALU	4,47	37083,5	0,55

As proteínas TBB4B (*Tubulin beta-4B chain*), TBA1B (*Tubulin alpha-1B chain*), e EZRL (*Ezrin*) estão envolvidas na manutenção do citoesqueleto e encontram-se sobre-expressas quando expostas ao composto ZM-II. As proteínas TBB4B e TBA1B são as principais constituintes dos microtúbulos, o componente chave do citoesqueleto (Yang e Hong, 2013). A proteína EZRL encontra-se na membrana citoplasmática e desempenha um papel importante na adesão e organização da estrutura celular (Olson e Sahai, 2009). A sobre-expressão destas proteínas poderá indicar que o composto ZM-II interfere nas proteínas de manutenção celular. Isto pode dever-se ao fato do composto em estudo apresentar a capacidade de induzir o processo apoptótico em células HCT116, tal como referido anteriormente na secção 3.5.1, logo provoca alteração no citoesqueleto celular, uma vez que as células apoptóticas sofrem diversas alterações na estrutura e organização celular.

A TCPB (*T-complex protein 1 subunit beta*) é uma chaperona citoplasmática que desempenha um papel importante no *folding* de proteínas mediante a hidrólise de ATP, incluindo a actina e tubulina (principais constituintes do citoesqueleto) e muitas proteínas envolvidas na proliferação do ciclo celular, entre as quais a ciclina E e B (Seo *et al.*, 2010). Desta forma, a sub-expressão desta proteína está relacionada com a progressão do ciclo celular (Boudiaf-Benmammar *et al.*, 2013). Por outro lado, a sobre-expressão desta proteína indica que não ocorre inibição da progressão do ciclo celular, uma vez que a ciclina E e B estão envolvidas na transição de G1/S e G2/M, respetivamente (Garrett, 2001). A proteína TCPB encontra-se sobre-expressa na presença do composto ZM-II, o que indica que não ocorreu a inibição da proliferação do ciclo celular. Este resultado estão de acordo com os resultados obtidos na análise da progressão do ciclo celular, que demonstraram que o composto ZM-II não apresenta a capacidade de induzir atraso na progressão do ciclo celular.

A TCTP (Translationally-controlled tumor protein), também denominada por p23, é uma proteína citoplasmática de ligação à tubulina que se associa aos microtúbulos durante o ciclo celular, mais precisamente durante as fases G1, S, G2 e, também, no início da mitose (Cans *et al.*, 2003; Yarm, 2002; Gachet *et al.*, 1999). Além disso, esta proteína é uma proteína nuclear hidrofílica altamente conservada que interage com a proteína Bcl-XL protegendo assim as células do processo apoptótico, e pode ser sobre-expressa por estímulos por metais pesados. Estudos recentes demonstram que as células de três linhas celulares tumorais expostas a oxaplatina apresentam a expressão da proteína TCTP aumentada durante 24 h, e posteriormente diminui progressivamente entre as 48 h e as 72 h. Pensa-se que a sobre-expressão de TCTP pode dever-se à exposição do metal de platina (oxaliplatina) e a diminuição subsequente poderá estar envolvida na resposta celular apoptótica (Yao *et al.*, 2009). Os níveis de expressão elevados de TCTP provocam alterações no citoesqueleto da célula, estabilizando

os microtúbulos, levando a um retardamento no início da mitose, que por sua vez provoca o retardamento na proliferação celular (Arcuri *et al.*, 2004; Cans *et al.*, 2003; Gachet *et al.*, 1999). A proteína TCPB encontra-se sobre-expressa na presença do composto ZM-II em células HCT116, o que indica que pode ocorrer o retardamento na proliferação celular, devido à estabilização dos microtúbulos e logo o retardamento no início da mitose. Este resultado foi verificado no ensaio da análise da progressão do ciclo celular e no ensaio de marcação com Hoeschst 33258, onde é possível observar a diminuição do número de células em divisão celular nas amostras tratadas com ZM-II.

As proteínas de *stress* oxidativo, tais como a PRDX2 (*Peroxiredoxin-2*), HSPB1 (*Heat shock protein beta-1*), HSP70B (*Heat shock 70 kDa protein 1A/1B*), HSP90B (*Heat shock protein HSP 90-beta*) e CALR (*Calreticulin*) encontram-se sobre-expressas na presença do composto ZM-II. Estas proteínas apresentam como função principal a eliminação de ROS, protegendo desta forma a célula de danos oxidativos. A PRDX2 pertence a um membro da família de proteínas de peroxiredoxinas e apresentam um papel na defesa antioxidante e na regulação de vias de sinalização redox (Peskin *et al.*, 2013). As HSP (*Heat Shock Protein*) pertencem a um grupo de proteínas que desempenham um papel importante no *folding* e *refolding* de outras proteínas (Wu, 1999). Níveis elevados de HSPs são rapidamente sintetizadas no interior da célula em resposta ao *stress* ambiental. Em condições de *stress*, regulam diretamente as vias de sinalização redox e antagonizam as cascatas de sinalização que resultam na apoptose (Madamanchi *et al.*, 2001). A calreticulina (CARL) é a principal proteína de ligação ao Ca^{2+} presente no retículo endoplasmático (RE). Em células normais atua predominante como uma proteína chaperona no *folding* de outras proteínas. Esta proteína quando exposta na superfície da célula funciona como sinal que permite que a célula seja reconhecida por células fagocíticas especializadas, e assim eliminada ao ser fagocitada e processada (Otteken e Moss, 1995). A CALR, tal como muitos chaperonas, pode ser expressa por carência de aminoácidos e choque térmico, o que indica que é uma proteína do *stress* oxidativo (Zhu e Wang, 2013). Desta forma, pode-se inferir que a indução da expressão destas proteínas poderá dever-se à existência de danos oxidativos provocados pela presença do composto ZM-II. Assim, o aumento dos níveis de expressão destas proteínas antioxidantes pode dever-se à tentativa de a célula contrariar a ação provocado pelo composto.

A proteína 1433S (*14-3-3 protein sigma*) está envolvida na inibição da proliferação celular através da ação de p53 nas fases G1 ou G2 (Hermeking *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2003) A sobre-expressão desta proteína provoca a inibição da progressão do ciclo celular. Resultados recentes demonstraram no entanto que níveis elevados de expressão da proteína 14-3-3 σ em células tumorais de cancro coloretal e pancreático tornam estas células resistentes ao

tratamento com cisplatina (Han *et al.*, 2009) A proteína 1433S encontra-se sobre-expressa quando exposta ao composto ZM-II pelo que este resultado poderá indicar uma resposta adaptativa da célula em resposta à exposição ao composto ZM II. Os resultados da análise da progressão do ciclo celular demonstram que o composto ZM-II provoca um possível retardamento na progressão do ciclo e não a sua inibição sendo que o ZM-II pode ter capacidade antiproliferativa superior à cisplatina.

A anexina A1 (ANXA1), também conhecida como p35, pertence a um membro da família de proteínas de ligação a fosfolípidos e cálcio, e está envolvida no processo anti-inflamatório e na regulação da diferenciação, proliferação celular e apoptose (Luthra *et al.*, 2008; Lecona *et al.*, 2008). Vários estudos demonstraram que a expressão da ANXA1 apresenta-se desregulada em vários carcinomas e linhas celulares tumorais (Lecona *et al.*, 2008). Foi descrito que a diminuição de expressão desta proteína está associada com diminuição da diferenciação em linfomas de células B e em diferentes tipos de tumores sólidos (cancro da mama, prostata ou tiróide), o que sugere que a anexina A1 pode ser um componente essencial para a manutenção do epitélio normal (Luthra *et al.*, 2008). Por outro lado, o aumento de expressão de anexina A1 tem sido descrito noutros tipos de cancro, como cancro do estômago, pâncreas ou esófago (Luthra *et al.*, 2008; Lecona *et al.*, 2008). Além disso, também sido verificado que o aumento da expressão desta proteína ocorre no epitélio normal e em diferentes linhagens celulares (Lecona *et al.*, 2008). A ANXA1 encontra-se sobre-expressa na presença do composto ZM-II, tendo por base que a ANXA1 pode encontrar-se sub- ou sobre-expressas consoante o tipo de cancro, pode-se inferir que em células HCT116 o composto ZM-II pode apresentar a capacidade e induzir o processo apoptótico e interferir na progressão celular, tal como verificado nos ensaios de dupla marcação com anexina V-FITC e IP ou a análise de progressão do ciclo celular em HCT116 expostas durante 24 h ao composto.

A SCRN1 (*secemin-1*) é um membro da família de proteínas *secernin*. Esta proteína está relacionada com um antígeno associado ao tumor. A proteína SCRN1 é considerada um biomarcador de diferentes tipos de cancro sendo que a sobre-expressão desta proteína pode ser considerado um fator de prognóstico no CRC (Miyoshi *et al.*, 2010). A SCRN1 encontra-se sobre-expressa na presença do composto ZM-II, o que permite inferir que a proteína pode ser considerada um biomarcador em células HCT116. Os dados obtidos indicam que a avaliação dos níveis de expressão desta proteína pode ser utilizada na deteção precoce desta linha celular tumoral.

A GLUD1 (*Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial*) é uma enzima localizada na matriz mitocondrial, que catalisa a desaminação oxidativa do glutamato em alfa-cetoglutarato (Kapoor *et al.*, 2009). A proliferação celular ocorre mais rapidamente nas células tumorais

comparativamente com as células saudáveis. Assim, estas células necessitam de alterações metabólicas em resposta aos sinais proliferativos e às necessidades de crescimento e divisão celular. Portanto, as células tumorais desencadeiam o processo de glicólise como forma de produzir energia em vez da fosforilação oxidativa. Isto deve-se ao fato de a glicólise ser um processo mais rápido do que a fosforilação oxidativa, proporcionando uma vantagem metabólica para células proliferativas (Cairns *et al.*, 2011; Weinberg *et al.*, 2010). A GLUT1 encontra-se sobre-expressa na presença do composto ZM-II, o que permite verificar que ocorreu o aumento do metabolismo celular nas células HCT116. Este resultado vai ao encontro do que seria de esperar, uma vez que esta proteína está envolvida no processo de glicólise (principal mecanismo de produção de ATP em células tumorais).

A ENOA (*alfa-enolase*) é uma isoenzima da enolase, uma proteína que catalisa a conversão de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato na via glicolítica. Esta isoforma tem sido detetada, não só no citoplasma, mas também na superfície da membrana plasmática. Ao contrário do que acontece nas células normais, nas células tumorais a alfa-enolase é convertida numa isoforma diferente. Assim, a capacidade de glicólise aumenta nestas células, devido ao aumento de proliferação celular (Takashima *et al.*, 2004). Esta proteína encontra-se sub-expressa na presença do composto ZM-II, uma vez que nas células tumorais a proteína ENOA é convertida noutra isoforma. Assim, com base nos resultados obtidos anteriormente que demonstram que o composto ZM-II pode provocar retardamento no ciclo celular, será de esperar que esta proteína se encontre sub-expressa em células HCT116 expostas ao composto em estudo.

A C1QBP (*Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial*) é uma proteína globular que interage com o primeiro componente da via clássica do sistema do complemento, C1q (McGee *et al.*, 2011). A C1QBP inibe a permeabilidade mitocondrial constituindo um inibidor da apoptose por via intrínseca. Além disso, esta proteína desempenha um papel importante na proliferação celular e resistência à morte celular e normalmente encontra-se sobre-expressa em HCT116 (McGee *et al.*, 2011). A QCR1 encontra-se sobre-expressa na presença do composto ZM-II, o que pode indicar a ativação de mecanismos de resistência aos danos mitocondriais em resultado da indução do processo apoptótico através da via intrínseca.

A RUBV2 (*RuB-like2*) é componente do complexo *NuA4 histone acetyltransferase* que está envolvido na ativação da transcrição de genes, principalmente por acetilação das histonas nucleossomais H4 e H2 (Weiske e Huber, 2005; Doyon *et al.*, 2004). Esta modificação pode alterar ambos os nucleossomas, a interação do DNA. Adicionalmente, a interação promotora de histonas modificadas com outras proteínas regulam positivamente a transcrição. Este

complexo pode ser necessário na ativação da transcrição de genes associados com proto-oncogenes que medeiam a indução do crescimento, genes supressores de tumor que mediam a paragem do ciclo celular e a senescência replicativa, apoptose e reparação de DNA (Doyon *et al.*, 2004). Assim, a RUVB2 encontra-se sobre-expressa na presença de composto ZM-II, o que pode indicar que o composto pode apresentar a capacidade de induzir o processo apoptótico, uma vez que esta proteína apresenta a função de ativar a transcrição de genes envolvidos na paragem do ciclo celular ou no processo apoptótico. Os resultados obtidos por citometria de fluxo vão ao encontro dos resultados obtidos na dupla marcação com Anexina V-FITC e IP.

A calumenina (CALU) pertence à subfamília de proteínas de ligação ao Ca^{2+} denominada CREC (*Cab45*, *Reticulocalbin*, *ERC-55*, *Calumenin*) (Wajih *et al.*, 2004). Estas proteínas encontram-se no retículo endoplasmático (RE), à exceção da CALU que se localiza distribuída por toda a via secretora. A sua função está relacionada com a libertação ou captação de Ca^{2+} , portanto alterações na expressão desta proteína pode alterar a homeostasia normal de Ca^{2+} (Amodio *et al.*, 2011). A CALU pode ser transportada do retículo endoplasmático para o citoplasma durante a paragem do ciclo celular e apoptose tardia, mas durante as fases iniciais da apoptose apresenta-se significativamente reduzida no citoplasma (Bull *et al.*, 2010). A proteína CALU encontra-se sub-expressa na presença do composto ZM-II em células HCT116, o que indica que provavelmente as células encontram-se maioritariamente em apoptose inicial. Este resultado está de acordo com os resultados obtidos na dupla marcação com Anexina V-FITC e IP das células HCT116 expostas ao composto ZM-II durante 48 h, o qual demonstrou que as células encontravam-se maioritariamente em apoptose tardia. Porém, no ensaio de proteómica as células foram expostas durante 24 h, logo as células presumivelmente deveram encontrar-se maioritariamente em apoptose inicial, o que possivelmente explica os baixos níveis de expressão desta proteína.

3.8 Detecção da Indução de Espécies Reativas de Oxigénio

Com base no conhecimento que o composto ZM-II apresenta a capacidade de induzir quebras na molécula de DNA, pretende-se avaliar se os danos na molécula de DNA, provocados na presença de composto, devem-se à formação de ROS. Assim, a fim de detetar a formação de ROS na presença do composto em estudo, foi analisada a atividade da enzima de stress oxidativo glutatona S-transferase bem como a indução de peroxidação lipídica.

3.8.1 Ensaio da Glutathione S-Transferase (GST)

A GST pertence a um grupo de enzimas importantes na desintoxicação promovida por diferentes xenobióticos nas células de mamíferos. Esta enzima protege as células contra diversos compostos tóxicos por conjugação do grupo tiol da glutathione com os xenobióticos electrófilos, e portanto protege contra a mutagénese, carcinogénese e efeitos tóxicos dos compostos (Sigma, 2007).

As células da linha tumoral HCT116 foram expostas ao composto ZM-II na concentração de 0,05 μ M. Para o ensaio, utilizou-se o Glutathione *S-Transferase* Assay Kit (Sigma), que se baseia no CDNB, um substrato apropriado para a ampla gama de isoenzimas de GST. A conjugação do grupo tiol da glutathione com o substrato CDNB induz um aumento na absorvância a 340 nm. Procedeu-se à leitura da absorvância a 340 nm, efetuando-se a leitura de 1 em 1 min por um período de 8 min. Cada amostra foi lida em três replicados. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 3.16 e os valores da atividade média da proteína das amostras incubadas com DMSO e ZM-II encontram-se na Figura 3.17.

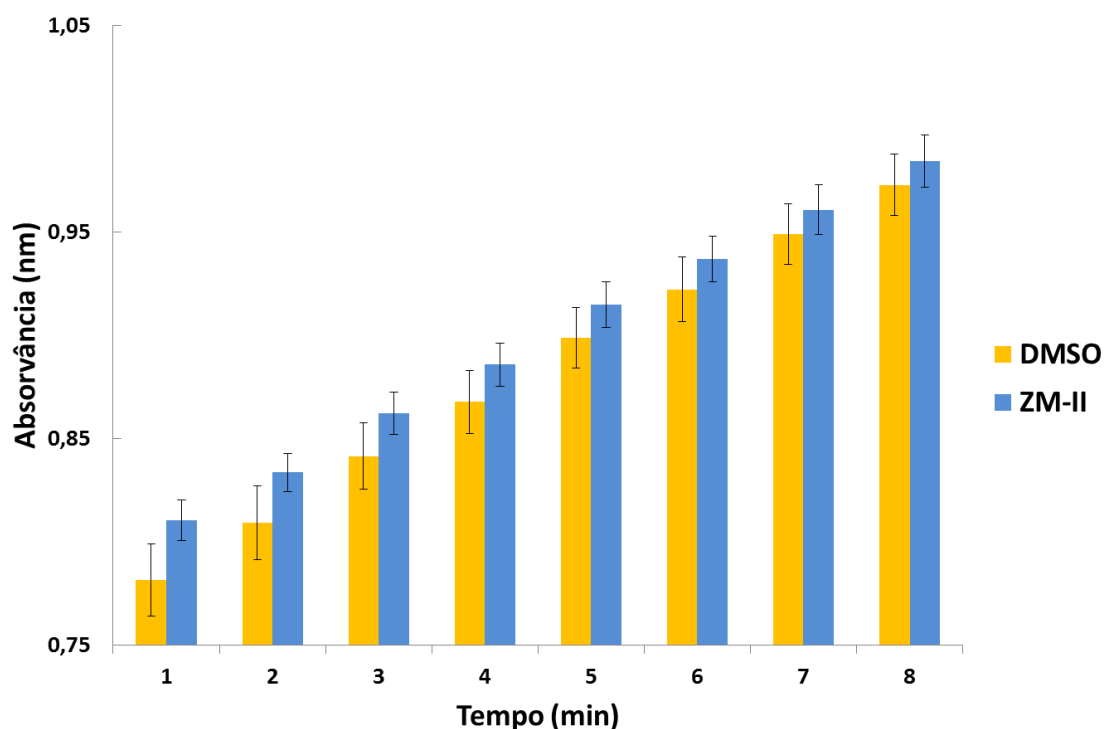


Figura 3.16 - Ensaio da atividade da GST para análise de formação de ROS, na presença de composto ZM-II na concentração de 0,05 μ M ou na ausência do mesmo (controlo 0,1 % (v/v) de DMSO) durante 24 h, no extrato de proteína total de células HCT116. O gráfico é representativo de três ensaios independentes.

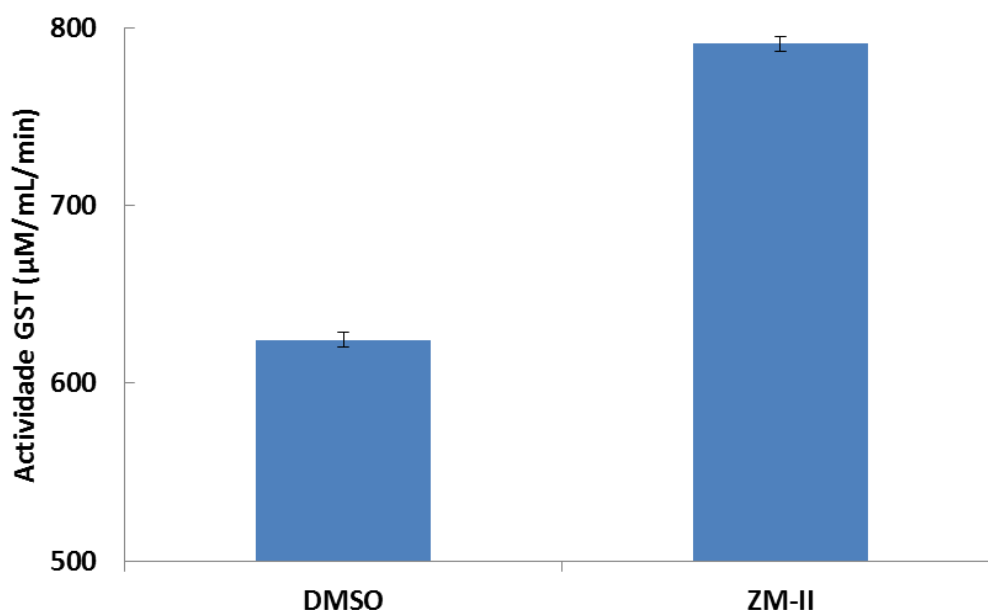


Figura 3.17 - Atividade da GST na presença de composto ZM-II na concentração de 0,05 µM ou na ausência do mesmo (controlo 0,1 % (v/v) de DMSO) durante 24 h, no extrato de proteína total de células HCT116. O gráfico é representativo de três ensaios independentes.

Através da análise do gráfico observa-se o aumento da absorvância do GS-DNB nas amostras incubadas com DMSO e ZM-II, verifica-se assim um aumento da atividade de GST nas duas condições em estudo. Uma vez que a absorvância do produto GS-CNB é diretamente proporcional à atividade de GST. A partir do declive das retas de calibração obtidas é possível determinar a atividade desta enzima. Assim, a atividade média da GST das amostras incubadas com DMSO é de 635,10 µM/mL/min e das amostras incubadas com ZM-II é de 782,57 µM/mL/min. Desta forma, verifica-se maior atividade da enzima GST no extrato proteico de células expostas ao composto em estudo. Apesar da diferença na atividade de GST observada nas duas amostras em estudo, para concluir com certeza sobre resultados obtidos, é importante comparar os resultados com um controlo negativo, sem adição de composto ZM-II e DMSO, e um controlo positivo, tal como o peróxido de hidrogénio, um agente redutor que provoca danos oxidativos nas células. Tem sido demonstrado que o peróxido de hidrogénio induz aumento de atividade da GST em células de mamíferos, a indução de GST por ROS é uma resposta de como esta enzima é capaz de desintoxicar de vários metabolitos produzidos dentro da célula por *stress* oxidativo, tais como o carbonil, peróxido de hidrogénio entre outros (Ketterer *et al.*, 1992)

A enzima GST protege as células contra diversos xenobióticos nas células de mamíferos, portanto as células expostas ao composto ZM-II apresentam uma maior atividade deste enzima, uma vez que as estas células deveram apresentar vários danos na molécula de DNA

(como verificado no ensaio *Comet*) e a ação da GST irá proteger contra a mutagenese, carcinogénese e feitos tóxicos dos compostos.

3.8.2 Análise de Peroxidação lipídica - Método TBARS (*Thiobarbituric acid reactive species*)

A formação de ROS pode induzir danos, não só na molécula de DNA e proteínas, mas também em ácidos gordos poli-insaturados, o principal constituinte dos fosfolípidos existentes na membrana plasmática, os quais são extremamente susceptíveis à peroxidação (Gago-Dominguez *et al.*, 2007; Halliwell e Chirico, 1993) A peroxidação lipídica resulta da ação dos radicais livres sobre os ácidos gordos poli-insaturados, que constituem a membrana plasmática, gerando principalmente L•, LO• e LOO•, que levam à destruição da estrutura da membrana celular, perda dos mecanismos de troca de metabolitos e, numa condição extrema, pode mesmo provocar a morte celular. As alterações na membrana plasmática levam à perda de permeabilidade da mesma, alterando o fluxo iónico e de outras substâncias, o que resulta consequentemente na perda de seletividade na entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, danos na molécula de DNA e o comprometimento dos componentes da matriz extracelular (Gago-Dominguez *et al.*, 2007; Valko *et al.*, 2006)

O método TBARS para a análise de peroxidação lipídica, baseia-se na capacidade do malondialdeído (MDA), uma dos produtos finais da peroxidação lipídica, que pode reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA), em condições ácidas e a elevadas temperaturas, formando um complexo MDA - (TBA)₂, que pode ser quantificado a 532 nm (Sochor *et al.*, 2012). Assim, a quantidade de MDA - (TBA)₂ é diretamente proporcional à quantidade de MDA.

Procedeu-se à leitura de absorvâncias a 532 nm de soluções *standard* de 0 a 0,3 µM de TBARS preparadas por diluição em água destilada para a construção de uma curva de calibração dependente da concentração de MDA. Seguidamente leu-se a absorvância. Os resultados obtidos foram normalizados com a concentração do extrato proteico total.

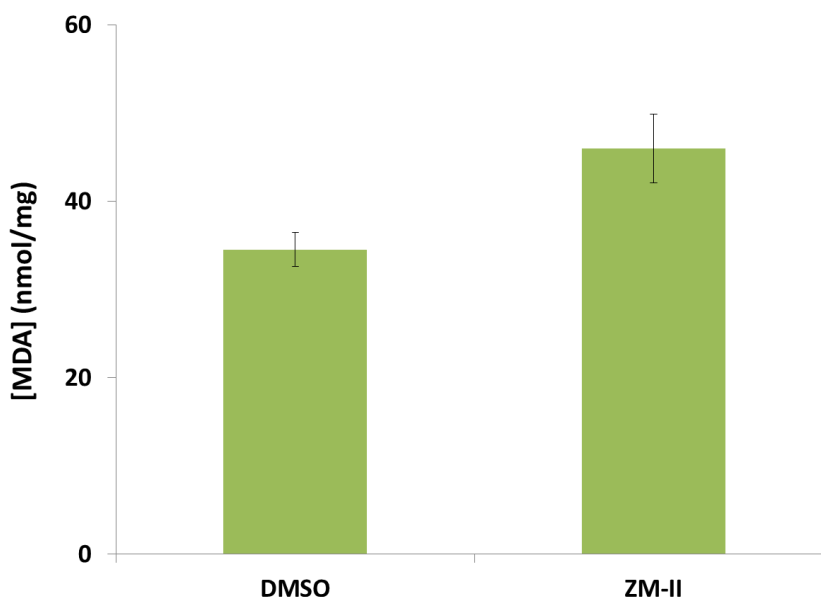


Figura 3.18 - Ensaio da peroxidação lipídica para análise de formação de ROS, na presença de composto ZM-II na concentração de 0,05 μ M ou na ausência do mesmo (controlo 0,1 % (v/v) de DMSO) durante 24 h, no extrato de proteína total de células HCT116. O gráfico é representativo de três ensaios independentes.

A partir da observação da figura 3.18 verifica-se um aumento significativo de MDA na amostra exposta ao composto ZM-II em relação ao controlo. Portanto, pode-se inferir que o composto pode induzir a peroxidação lipídica, uma vez que, tal como referido anteriormente, a peroxidação lipídica pode ser indicada através da quantidade MDA, e este por sua vez é diretamente proporcional à quantidade de complexo MDA - $(TBA)_2$. Assim, é possível deduzir que o composto ZM-II pode também induzir o seu efeito anti-tumoral nas células tumorais através da via de peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica é o único dano oxidativo promovido por diferentes membros de radicais da família de ROS, ou por decomposição catalítica de hidroperóxidos lipídicos (peróxidos) em diferentes tecidos (Niki et al, 2005). Portanto, a partir deste resultado não é possível inferir que o composto apresenta a capacidade de induzir danos oxidativos por ROS ou decomposição catalítica de hidroperóxidos lipídicos nas células HCCT116. No entanto, para confirmar os resultados obtidos será necessário determinar a concentração de MDA presente num controlo negativo (sem adição de DMSO ou ZM-II) e num controlo positivo (H_2O_2). Assim, seria possível determinar se o valor de MDA obtido para a amostra tratada com ZM-II é biologicamente significativo.

4. Conclusão e Perspetivas Futuras

O composto ZM-II apresenta uma elevada citotoxicidade nas linhas celulares tumorais HCT116, HepG2 e MCF-7 (IC_{50} de 0,066, 0,241 e 2,694 μ M, respetivamente). Acresce que este composto demonstrou uma maior seletividade para as células das linhas tumorais (HCT116 > HepG2 > MCF7) comparativamente às células de duas linhas não-tumorais de fibroblastos e epitélio de mama (IC_{50} 5,483 e 5,901 μ M, respetivamente). Os resultados obtidos no ensaio de dupla marcação com Anexina V-FITC e IP após exposição das células tumorais ao composto ZM-II indicam que a citotoxicidade poderá dever-se à indução da apoptose uma vez que verificou-se o aumento de células em apoptose com o aumento de concentração de composto. A partir deste ensaio assumiu-se o processo apoptótico como o principal mecanismo pelo qual o composto ZM-II promove o seu efeito antiproliferativo. Estes resultados foram confirmados pela análise de expressão de genes envolvidos no processo apoptótico (*BAX*, *BCL-2* e *CASP3*) através de RT-PCR tendo sido comprovado que o composto ZM-II apresenta a capacidade de induzir o processo apoptótico, uma vez que se verifica aumento na razão *BAX/BCL-2* nas 6 horas indicativo na iniciação da cascata apoptótica e um aumento da expressão de *Casp3* a partir das 6 horas indicativo do início da execução do processo apoptótico. Outro mecanismo pelo qual o composto ZM-II promove o seu efeito citotóxico é o retardamento na progressão do ciclo celular em G0/G1 ou G2/M. A fim de confirmar esta hipótese, serão posteriormente realizados estudos de expressão de genes envolvidos no ciclo celular. Estudos *in vitro*, designadamente espectroscopia de absorção e EMSA na dependência do tempo, revelaram a existência de interação entre o composto ZM-II e a molécula de DNA. Observou-se a existência de hipocromismo e a ausência de desvio batocrómico no espectro de absorção do composto, com o aumento da concentração de CT-DNA em solução. O valor de K_b obtido para o composto ZM-II foi de $1,73 (\pm 0,7) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, o que demonstra que o composto apresenta afinidade para a molécula de DNA. Relativamente, ao ensaio EMSA na dependência do tempo verifica-se uma diminuição da percentagem da forma superenrolada (Forma I) e da forma circular relaxada (Forma II) e por outro lado observa-se aumento da percentagem da forma linear (Forma III), o que nos permite concluir que o composto apresenta a capacidade de induzir quebras em cadeia dupla na molécula de DNA. Com o Ensaio *Comet* verificou-se que as células expostas a 0,1 μ M de composto ZM-II apresentam uma % de DNA na cauda semelhante às células expostas ao controlo positivo H_2O_2 . No entanto, torna-se importante determinar o mecanismo de clivagem do DNA, promovida pela presença do composto ZM-II, sendo para tal necessário realizar ensaios de interação com agentes redutores, como por exemplo, o DMSO, azida de sódio, ácido ascórbico, glicerol, manitol, catálase ou peróxido de hidrogénio, a fim de

determinar se a clivagem de DNA, promovida pela presença do composto em estudo, ocorre devido à presença de ROS, tais como os radicais hidroxílos ou superóxidos, ou em alternativa por uma quebra hidrolítica na molécula de DNA. Por forma a identificar os potenciais alvos biológicos da exposição ao composto ZM-II foi realizada a análise do proteoma de linhas tumorais HCT116 tendo sido verificado que as proteínas identificadas estão envolvidas em vários mecanismos, nomeadamente no processo apoptótico, na manutenção do citoesqueleto e na progressão/paragem do ciclo celular e na resposta ao *stress* oxidativo. A deteção de formação de ROS na presença do composto foi constatada por análise da atividade de GST e níveis de peroxidação lipídica. Na atividade média da GST, verificou-se uma maior atividade da enzima GST no extrato proteico de células expostas ao composto ZM-II em relação ao controlo. Dado que a diferença na atividade de GST observada não foi significativa para concluir com certeza sobre resultados obtidos, sendo importante comparar os resultados obtidos com um controlo negativo (ausência de DMSO e ZM-II) e um controlo positivo (H_2O_2). No entanto, dado que as células apresentam danos na molécula de DNA (ensaio EMSA e Comet), faz sentido a atividade de GST estar aumentada no sentido de um mecanismo de proteção celular aos efeitos tóxicos do composto. Em relação à peroxidação verifica-se um aumento dos níveis de peroxidação na amostra exposta ao composto comparativamente ao controlo. Assim, é possível deduzir que o composto ZM-II pode também induzir o seu efeito anti-tumoral nas células tumorais através da via de peroxidação lipídica.

5. Referências Bibliográficas

- Abraham, R. T. 2001. Cell Cycle checkpoint signaling thought. *Genes Development* 15:2177-2196
- Alama, A., Tasso, B., Novelli, F., Sparatore, F. 2009. Organometallic compounds in oncology: implications of novel organotin compounds as antitumor agents. *Drug Discovery Today* 14(9-10): 500-508.
- Alshatwi, A. A. 2010. Catechin hydrate suppresses MCF-7 proliferation through TP53/Caspase-mediated apoptosis. *Journal of Experimental Clinical Cancer Research* 29: 167.
- Aghaee, F., Islamian, J. P., Baradaran, B., Mesbahi, A., Mohammadzadeh, M., Jafarabadi, M. A. 2013. Enhancing the Effects of Low Dose Doxorubicin Treatment by the Radiation in T47D and SKBR3 Breast Cancer Cells. *Journal of Breast Cancer Cell* 16(2): 164-170.
- Amaral, J. D., Xavier, J. M., Steer, C. J., Rodrigues C. M. 2010. The Role of p53 in Apoptosis. *Discovery Medicine* 9: 145-152.
- Amaravadi, R. K. e Thompson, C. B. 2007. The Roles of Therapy-Induced Autophagy and Necrosis in Cancer Treatment. *Clinical Cancer Research* 13: 7271-7279.
- Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai O. S., Sung, B. e Aggarwal, B. B. 2008. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research* 25(9): 2097-2116.
- Antoniou, A. C., A. B. Spurdle, O. M. Sinilnikova, S. Healey, K. A. Pooley, R. K. Schmutzler, B. Versmold, C. Engel, A. Meindl, N. Arnold, W. Hofmann, C. Sutter, D. Niederacher, H. Deissler, T. Caldes, K. Kampjarvi, H. Nevanlinna, J. Simard, J. Beesley, X. Chen, C. Kathleen Cuninghame Consortium for Research into Familial Breast, S. L. Neuhausen, T. R. Rebbeck, T. Wagner, H. T. Lynch, C. Isaacs, J. Weitzel, P. A. Ganz, M. B. Daly, G. Tomlinson, O. I. Olopade, J. L. Blum, F. J. Couch, P. Peterlongo, S. Manoukian, M. Barile, P. Radice, C. I. Szabo, L. H. Pereira, M. H. Greene, G. Rennert, F. Lejbkiewicz, O. Barnett-Griness, I. L. Andrulis, H. Ozelik, Ocn, A. M. Gerdes, M. A. Caligo, Y. Laitman, B. Kaufman, R. Milgrom, E. Friedman, B. Swedish, B. s. collaborators, S. M. Domchek, K. L. Nathanson, A. Osorio, G. Llort, R. L. Milne, J. Benitez, U. Hamann, F. B. Hogervorst, P. Manders, M. J. Ligtenberg, A. M. van den Ouweland, D.-H. collaborators, S. Peock, M. Cook, R. Platte, D. G. Evans, R. Eeles, G. Pichert, C. Chu, D. Eccles, R. Davidson, F. Douglas, Embrace, A. K. Godwin, L. Barjhoux, S. Mazoyer, H. Sobol, V. Bourdon, F. Eisinger, A. Chompret, C. Capoulade, B. Bressac-de Paillerets, G. M. Lenoir, M. Gauthier-Villars, C. Houdayer, D. Stoppa-Lyonnet, Gemo, G. Chenevix-Trench, D. F. Easton, Cimbá. 2008. Common breast cancer-predisposition alleles are associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *The American Journal of Human Genetics - Cell* 82(4): 937-948.
- Anzola, M. 2004. Hepatocellular carcinoma: role of hepatitis B and hepatitis C viruses proteins in hepatocarcinogenesis. *Journal of Viral Hepatitis* 11: 383-393.
- Austen, K. F., Honjo, T., Melchers, F., Uhr, W. J., Unanue, E. R. 2007. Role of AID in Tumorigenesis. *Advances in Immunology*. 94: 245-273.

- Bajetta, E., Gevorgyan, A., Mellstedt, H. 2007. National integration of European standards. *Annals Oncology* 18(6): 969-970.
- Bartel, C., Bytzek, A.K., Scaffidi-Domianello, Y.Y., Grabmann, G., Jakupiec, M.A., Hartinger, C.G., Galanski, M. e Keppler, B.K. 2012. Cellular accumulation and DNA interaction studies of cytotoxic trans-platinum anticancer compounds. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 17: 465-474.
- Bartkova, J., Hor, Z., Koed, K., Krämer, A., Tort, F., Guldberg, P., Sechested, M., Nesland, J. M., Lukas, C., Ørntoft, T., Lukas, J., Bartek, J. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis *Nature*. 434: 864-870.
- Bertram, J. 2011. The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine* 21: 167-223
- Bharali, D. e Mousa, S. 2010. Emerging nanomedicines for early cancer detection and improved treatment: Current perspective and future promise. *Pharmacology & Therapeutics* 128: 324-335.
- Boland C. R., Sinicrope, F. A. 2000. D. E. Brenner, J. M. Carethers, Colorectal cancer prevention and treatment, *Gastroenterology* 118: 115–128.
- Borralho, P.M., Kren, B.T., Castro, R.E., Silva, I.B.M., Steer, C.J. e Rodrigues, C.M.P. 2009. MicroRNA-143 reduces viability and increases sensitivity to 5-fluorouracil in HCT116 human colorectal cancer cells. *FEBS Journal* 276: 6689-6700.
- Boulikas, T., Pantos, A., Bellis, E., Christofis, P. 2007. Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms. *Cancer Therapy* 5: 537-583.
- Boyle, P. e Levin, B. 2008. *World Cancer Report* Lyon, International Agency for Research on Cancer.
- Brattain MG, et al. Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. 1981. *Cancer Research*. 41: 1751-1756.
- Brumatti, G., Sheridan, C. e Martin, S.J. 2008. Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. *Methods* 44: 235-240.
- Cao, P., Cai, X., Lu, W., Zhou, F. e Huo, J. 2011. Growth Inhibition and Induction of Apoptosis in SHG-44 Glioma Cells by Chinese Medicine Formula “Pingliu Keli”. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011: 1-9. DOI: 10.1155/2011/958243.
- Cans, C., Passer, B., Shalak, V., Nancy-Portebois, V., Crible, V., Amzallag, N., Allanic, D., Tufino, R., Argentinis, M., Moras, D., Fiucci, G., Goud, B., Mirande, M., Amson R., Teleman, A. 2003. Translationally controlled tumor protein acts as a guanine nucleotide dissociation inhibitor on the translation elongation factor eEF1A. 100: 13892–13897.
- Cairns, R. A., Harris, I. S. e Mak, T. W. 2011. "egulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer* 11(2): 85-95.
- Carethers J. M. 2008. Systemic treatment of advanced colorectal cancer: Tailoring therapy to the tumor, *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 33-62.
- Centelles, J. J. 2012. General aspects of colorectal cancer.

- Chan, K. S., Sano, S., Kiguchi, K., Anders, J., Komazawa, N., Takeda J., DiGiovanni, J. 2004. Disruption of Stat3 reveals a critical role in both the initiation and the promotion stages of epithelial carcinogenesis. *Journal of Clinical Investigation* 114(5): 720-728.
- Chabner, B.A. e Roberts, T.G. 2005. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer* 5: 65-72.
- Chen, Y., Zhuang, Y., Xu, Z., Lu, L., Guo W., Liao, X. 2013. Higenamine Combined with [6]-Gingerol Suppresses Doxorubicin-Triggered Oxidative Stress and Apoptosis in Cardiomyocytes via Upregulation of PI3K/Akt Pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013.
- Chipuk, J.E. e Green, D.R. 2008. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?. *Trends in Cell Biology* 18: 157-164.
- Choen, G. M. 1997. Caspases - the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal* 326: 1-16.
- Collins, A. R., V. L. Dobson, M. Dusinska, G. Kennedy and R. Stetina. 1997. The comet assay: what can it really tell us?. *Mutation Research* 375(2): 183-193.
- Collins, A. R., A. A. Osoz, G. Brunborg, I. Gaivao, L. Giovannelli, M. Kruszewski, C. C. Smith and R. Stetina. 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23(3): 143-151.
- Croce, C. 2008. Oncogenes and Cancer. *The new england journal of medicine* 2008: 358:502.
- Datta, S. R., Brunet, A., Greenberg, M. E. 1999. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & Development* 13:2905–2927.
- Danial N. N. e S. J. Krosmeier. 2004. Cell death: critical control points. *Cell*. 116(2): 205-19.
- Debatin, K. M. 2004. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 53(3): 153-159.
- Desoize, B. 2004. Metals and Metal Compounds in Cancer Treatment. *Anticancer Research* 24: 1529-1544.
- Desoize, B. e Madoulet, C. 2002. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 42: 317-325.
- Dubsky, P., Filipits, M., Jakesz, R., Rudas, M., Singer, C. F., Greil, R., Dietze, O., Luisser, I., Klug, E., Sedivy, R. M. Bachner, D. Mayr, M. Schmidt, M. C. Gehrman, C. Petry, K. E. Weber, R. Kronenwett, J. C. Brase. 2012. EndoPredict improves the prognostic classification derived from common clinical guidelines in ER-positive, HER2-negative early breast cancer. *Annals of Oncology* 24: 640-647.
- Dyson, P.J. e Sava, G. 2006. Metal-based antitumour drugs in the post genomic era. *Dalton Transactions* 16: 1929-1933.
- Doyon, Y., Selleck, W., Lane, W., Tan, S., Cote, J., Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Molecular Cell Biology* 24:1884-1896
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 35(4): 495-516.

- Esteller, M., M. Sanchez-Cespedes, D. Sidransky, S. B. Baylin, e J. G. Herman. 1999. Detection of Aberrant Promoter Hypermethylation of Tumor Suppressor Genes in Serum DNA from Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Cancer Research* 59: 67-70.
- Evan, G. and K. Vousdent 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411: 342-348.
- Fan, T., L. Han, R. Cong and J. Liang 2005. Caspases Family Proteases and Apoptosis. *Institute of Biochemistry and Cell Biology* 11: 719-727.
- Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Ilio, D., Laurenzi V. 2012. Role of Apoptosis in disease. *Aging* 4(5):330-349
- Feng, S. e Chien, S. 2003. Chemotherapeutic engineering: Application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. *Chemical Engineering Science* 58: 4087 – 4114.
- Feng, S., Z. Lingyun, Z. Zhiping, G. Bhakta, K. YinWina, Y. Diona and S. Chien. 2007. Chemotherapeutic engineering: Vitamin E TPGS-emulsified nanoparticles of biodegradable polymers realized sustainable paclitaxel chemotherapy for 168 h in vivo. *Chemical Engineering Science* 62: 6641 – 6648.
- Festjens, N., Berghe, T. V. e Vandenabeele, P. 2006. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et Biophysica Acta* 1757: 1371-1387.
- Ferlay, J., P. Autier, M. Boniol, M. Heanue, M. Colombet and P. Boyle (2007). Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals Oncology* 18(3): 581-592.
- Ferreira, C. G., M. Epping, F. A. E. Krut and G. Giaccone. 2002. Apoptose. Target of Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research* 8: 2024–2034.
- Formigli, L., Tani, A., Schiavone, N., Tempestini, A., Orlandini, G. E., Capaccioli, S., Zencchi Orlandini, S. 2000. Aponecrosis - Morphological and Biochemical Exploration of a Syncretic Process of Cell Death Sharing Apoptosis and Necrosis. *Journal of Cellular Physiology* 182: 41-49.
- Fornari, F., L. Gramantieri, M. Ferracin, L. Bolondi, A. Veronese, S. Sabbioni, G. A. Calin, G. L. Grazi, C. Giovannini, C. M. Croce and M. Negrini. 2008. MiR-221 controls CDKN1C p57 and CDKN1B p27 expression in human MiR-221 controls CDKN1C p57 and CDKN1B p27 expression in human. *Oncogene* 27: 5651-5661.
- Fuertes, M.A., Alonso, C. e Pérez, J.M. 2003. Biochemical Modulation of Cisplatin Mechanisms of Action: Enhancement of Antitumor Activity and Circumvention of Drug Resistance. *Chemical Reviews* 103: 645-662.
- Garrett, M.D. 2001. Cell cycle control and cancer. *Current Science* 81: 515-522.
- Gabano, E., Colangelo, D., Ghezzi, A.R. e Osella, D. 2008. The influence of temperature on antiproliferative effects, cellular uptake and DNA platination of the clinically employed Pt(II)-drugs. *Journal of Inorganic Biochemistry* 102: 629-635.
- Gago-Dominguez, M., Jiang, X. e Castela, J. E. 2007. Lipid peroxidation, oxidative stress genes and dietary factors in breast cancer protection: a hypothesis. *Breast Cancer Research* 9:201.

- Gallego, B., Kaluđerović, M.R., Kommera, H., Paschke, R., Hey-Hawkins, E., Remmerbach, T.W., Kaluđerović, G.N. e Gómez-Ruiz, S. 2011. Cytotoxicity, apoptosis and study of the DNA-binding properties of bi- and tetranuclear gallium(III) complexes with heterocyclic thiolato ligands. *Investigational New Drugs* 29: 932-944.
- Ghobrial, I., T. Witzig e A. Adjei. 2005. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *Cancer Journal Clinical* 55: 178-194.
- GLOBOCAN: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 2008. <http://globocan.iarc.fr> (Acedido em Junho de 2013).
- Goldberg R. M., D. J. Sargent, R. F. Morton, C. S. Fuchs, R. K. Ramanathan, S. K. Williamson, B. P. Findlay, H. C. Pitot, S. R. Alberts. 2004. A Randomized Controlled Trial of Fluorouracil Plus Leucovorin, Irinotecan, and Oxaliplatin Combinations in Patients With Previously Untreated Metastatic Colorectal Cancer, *Journal of Clinical oncology* 22(1), 23-30.
- Golstein, P. e G. Kroemer. 2007. A multiplicity of cell death pathways. Symposium on apoptotic and non-apoptotic cell death pathways. *EMBO Reports* 8(9): 829-833.
- Gonzalez, V.M., Fuertes, M.A., Alonso, C. e Perez, J.M. 2001. Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis?. *Molecular Pharmacology* 59: 657-663.
- Gonzalez-Conejero, Corral, J., Rolda, V., Ferrer, N. F., Sanchez-Serrano, I., Sanchez-Blanco, J. J., Marin, F., Vicente, V. 2007. The genetic interaction between VKORC1 c1173t and calumenin a29809g modulates the anticoagulant response of acenocoumarol. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5: 1701–1706.
- Gramantieri, L., M. Ferracin, F. Fornari, A. Veronese, S. Sabbioni, G. A. Calin, C. Giovannini, G. L. Grazi, C. M. Croce, L. Bolondi and M. Negrini. 2007. Cyclin G1 Is a Target of miR-122a, a MicroRNA Frequently; Down-regulated in Human Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research* 67: 6092-6099.
- Gupta, G. P. e Massagué, J. 2006. Cancer Metastasis: Building a Framework. *Journal of Cell* 679-695.
- Hadjiladis, N. D. e Sletten, E. 2009. Metal complex-DNA interactions. Chichester, West Sussex, U.K., Wiley.
- Haggar, F. A. e Boushey, R. P. 2009. Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors. *Clinical Colon Rectal Surgery*. 22(4): 191–197.
- Hanahan, D. e Weinberg, R.A. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Hanahan, D. e R. A. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5): 646-674.
- Hannon, M.J. 2007. Metal-based anticancer drugs: From a past anchored in platinum chemistry to a post-genomic future of diverse chemistry and biology. *Pure and Applied Chemistry* 79: 2243-2261.
- Hermeking H., Benzinger A. 2006. 14-3-3 proteins in cell cycle regulation, *Seminars in cancer biology*. 16, 83-92.

- Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B. e Sharma, R.A. 2008. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 8: 193-204.
- Hoechst Stains, MP21486, Invitrogen 2005.
- Ho, T. F., Ma, C. J., Lu, C. H., Tsai, Y. T., Wei, Y. H., Chang, J. S., Lai, J. K., Cheuh, P. J., Yeh, C. T., Tang, P. C., Tsai Chang, J., Ko, J. L., Liu, F. S., Yen, H. E. e Chang, C. C. 2007. Undecylprodigiosin selectively induces apoptosis in human breast carcinoma cells independent of p53. *Toxicology and Applied Pharmacology* 225(3): 318-328.
- Horn, A., Vencato, I., Bortoluzzi, A.J., Hörner, R., Silva, R.A.N., Spoganicz, B., Drago, V., Terenzi, H., Oliveira, M.C.B., Werner, R., Haase, W. e Neves, A. 2005. Synthesis, crystal structure and properties of dinuclear iron(III) complexes containing terminally coordinated phenolate/H₂O/OH⁻ groups as models for purple acid phosphatases: efficient hydrolytic DNA cleavage. *Inorganica Chimica Acta* 358: 339-351.
- Iacopetta B. 2002. Are there two sides to colorectal cancer?. *Internacional Journal of Cancer*. 101: 403-408.
- Iakovidis, I., I., Delimaris, e S. M. Piperakis. 2011. Copper and Its Complexes in Medicine: A Biochemical Approach. *Molecular Biology International*. 2011: 1-13.
- Iwata, N., H. Yamamoto, S. Sasaki, F. Itoh, H. Suzuki, T. Kikuchi, H. Kaneto, I. S., I. Ozeki, Y. Karino, T. Satoh, J. Toyota, M. Satoh, T. Endo and K. Iwai. 2000. Frequent hypermethylation of CpG islands and loss of expression of the 14-3-3 sigma gene in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 19: 5298-5302.
- Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward and D. Forman. 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer Journal for Clinicians* 61(2): 69-90.
- Jin, Y., D. Zeruesenay, Stearns V., Ward, B., Ho H., Lee K., Skaar, T., Storniolo A., Li L., Araba A., Blanchard, R., Nguyen A., Ullmer L., Hayden J., Lemler S., Weinshilboum R. M., Rae J. M., Hayes D. F., Floclhart D. A. 2005. CYP2D6 Genotype, Antidepressant Use, and Tamoxifen Metabolism During Adjuvant Breast Cancer Treatment. *Journal of the National Cancer Institute*. 97: 30-39.
- Johnstone, R.W., Ruefli, A.A. e Lowe, S.W. 2002. Apoptosis: A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy. *Cell* 108: 153-164.
- Keck, M.V. e Lippard, S.J. 1992. Unwinding of supercoiled DNA by platinum-ethidium and related complexes. *Journal of the American Chemical Society* 114:3386-3390.
- Kelland, L. 2007. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer* 7: 573-584.
- Kelsen, D.P., Ginsberg, R., Pajak, T.F., Sheahan, D.G., Gunderson, L., Mortimer, J., Estes, N., Haller, D.G., Ajani, J., Kocha, W., Minsky, B.D. e Roth, J.A. 1998. Chemotherapy Followed by Surgery Compared with Surgery Alone for Localized Esophageal Cancer. *The New England Journal of Medicine* 339: 1979-1984.
- Ketterer, B., Harris, J., Talaska, G., Meyer, D., Pemble, S., Taylor, J., Lang, N., Kadlubar. F. 1992. The Human Glutathione S-Transferase Supergene Family, Its Polymorphism, and Its

- Effects on Susceptibility to Lung Cancer. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 98, 87-94.
- Kim, J.-S., He, L. e Lemasters, J.J. 2003. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 304: 463-470.
- Knowles B., Aden D. 1983. Human hepatoma derived cell line, process for preparation thereof, and uses therefor.
- Kostova, I. 2006. Platinum Complexes as Anticancer Agents. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* 1: 1-22.
- Kovvali, G. 2002. Carcinogenesis and cancer prevention: the process and the disease deserve a better understanding. *Journal of Carcinogenesis* 1: 1-2. DOI: 10.1186/1477-3163-1-1
- Kroemer, G., W. S. El-Deiry, P. Golstein, M. E. Peter, D. Vaux, P. Vandenabeele, B. Zhivotovsky, M. V. Blagosklonny, W. Malorni, R. A. Knight, M. Piacentini, S. Nagata, G. Melino and D. Nomenclature Committee on Cell. 2005. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 12 (2): 1463-1467.
- Kundu, J. K. e Y. J. Surh. 2004. Molecular basis of chemoprevention by resveratrol: NF-kappaB and AP-1 as potential targets. *Mutation Research* 555(1-2): 65-80.
- Lacey, J. V., Devesa S. S., e Brinton, L. A. 2002. Recent Trends in Breast Cancer Incidence and Mortality. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 39:82-88
- Lecona, E., Barrasa, J. I., Olmo, N., Llorente B., Turnay, J., Lizarbe, M. A. 2008. Upregulation of Annexin A1 Expression by Butyrate in Human Colon Adenocarcinoma Cells: Role of p53, NF-Y, and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *Molecular and Cellular Biology*. 28: 15.
- Lee, B., S. H. Kim, T. Jin, E. Y. Choi, J. Oh, S. Park, S. H. Lee, J. H. Chung and K. S. 2013. Protective Effect of Survivin in Doxorubicin-Induced Cell Death in H9c2 Cardiac Myocytes. *The Korean Society of Cardiology* 43: 400-407.
- Liao, L.B., Zhou, H.Y. e Xiao, X.M. 2005. Spectroscopic and viscosity study of doxorubicin interaction with DNA. *Journal of Molecular Structure* 749: 108-113Lin, Z.P., Lee, Y., Lin, F., Belcourt, M.F., Li, P., Cory, J.G., Glazer, P.M. e Sartorelli, A.C. 2011. Reduced Level of Ribonucleotide Reductase R2 Subunits Increases Dependence on Homologous Recombination Repair of Cisplatin-Induced DNA Damage. *Molecular Pharmacology* 80: 1000-1012.
- Liu, J., Zhang, H., Chen, C., Deng, H., Lu, T. e Ji, L. 2003. Interaction of macrocyclic copper(II) complexes with calf thymus DNA: effects of the side chains of the ligands on the DNA-binding behaviors. *Dalton Transactions* 1: 114-119.
- Livak, K. e Schmittgen, T. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *METHODS* 25, 402-408
- Llovet, J. M., Burroughs, A., Bruix, J. 2003. Hepatocellular carcinoma. *The Lancet Oncology* 362(9399): 1907-1917.

- Longley, D.B. e Johnston, P.G. 2005. Molecular mechanisms of drug resistance. *Journal of Pathology* 205: 275-292. Luo, J., N. L. Solimini e S. J. Elledge. 2009. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 136(5): 823-837.
- Lowe, S.W. e Lin, A.W. 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21:485-495.
- Luís, D.V.A. 2011. Caracterização do efeito anti-tumoral de complexos organometálicos contendo 1,10-fenantroline-5,6-diona. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. (http://run.unl.pt/bitstream/10362/6265/1/Luis_2011.pdf)
- Luo, H., Daddysman, M.K., Rankin, G.O., Jiang, B.-H. e Chen, Y.C. 2010. Kaempferol enhances cisplatin's effect on ovarian cancer cells through promoting apoptosis caused by down regulation of cMyc. *Cancer Cell International* 10: 1-9. DOI: 10.1186/1475-2867-10-16
- Lynch, H. e A. Chapelle. 2003. Hereditary Colorectal Cancer. *The new england journal of medicine* 348: 919-932.
- Mondal, S., Bhattacharya, K., Mallick, A., Sangwan, R. e Mandal, C. 2012. Bak Compensated for Bax in p53-null Cells to Release Cytochrome c for the Initiation of Mitochondrial Signaling during Withanolide D-Induced Apoptosis 7:1-11.
- Majno, G. e I. Joris. 1994. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. *American Journal of Pathology*. 146: 3-15.
- Mancin, F. e Tecilla, Paolo. 2009. Artificial Restriction Agents: Hydrolytic Agents for DNA Cleavage. In *Metal Complex-DNA Interactions* (N. Hadjiladis e E. Sletten eds), 1a ed., pp 269-394, Wiley, Chichester.
- Manov, I., e Y. Pollak 2011. Inhibition of doxorubicin-induced autophagy in hepatocellular carcinoma Hep3B cells by sorafenib--the role of extracellular signal-regulated kinase counteraction. *FEBS Journal* 278 (18): 3494-3507.
- Marzano, C., M. Pellei, F. Tisato, e C. Santini. 2009. Copper Complexes as Anticancer Agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 9: 185-211.
- Matos, M.R.P.N. 2001. Complexos Metálicos na terapêutica do Cancro. *Sociedade Portuguesa de Química* 85: 61-68.
- McGee, A. M., Douglas, D. L., Liang, Y., Hyder, S. M. e Baines, C. P. 2011. The mitochondrial protein C1qbp promotes cell proliferation, migration and resistance to cell death. *Cell Cycle* 10(23): 4119-4127.
- McGowan, E.M., Alling, N., Jackson, E.A., Yagoub, D., Haass, N.K., Allen, J.D. e Martinello-Wilks, R. 2011. Evaluation of Cell Cycle Arrest in Estrogen Responsive MCF-7 Breast Cancer Cells: Pitfalls of the MTS Assay.
- McPherson, K., C. M. Steel and J. M. Dixon. 2000. Breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics. *British Medical Journal* 321(7261): 624-628.
- Michor, F., Y. Iwasa, C. Lengauer, M. A. Nowak. 2005. Dynamics of colorectal cancer, *Seminars in Cancer Biology*. 15: 484-493.

- Millan, A. e S. Huerta. 2009. Apoptosis-inducing fator and colon cancer. *Journal Surgical Research* 151(1): 163-170.
- Morten, O., Hansen, G. A. W., Vorum, H., Honoré, B. 2006. Proteomic profiling of fibroblasts reveals a modulating effect of extracellular calumenin on the organization of the actin cytoskeleton. *Proteomics*. 6, 3509–3519.
- Natile, G., e M. Coluccia. 2001. Current status of trans-platinum compounds in cancer therapy. *Coordination Chemistry Reviews*. 383-410.
- Neidle, S. (1979). "The molecular basis for the action of some DNA-binding drugs." *Prog Med Chem*. 16: 151-221.
- O'Brien, C. A., A. Pollett, S. Gallinger and J. Dick. 2007. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445: 106-110.
- O'Donovan P. J. e Livingston D. M. 2010. BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. *Carcinogenesis*. 31(6): 961-7
- Onoa, G.B. e Moreno, V. 2002. Study of the modifications caused by cisplatin, transplatin, and Pd(II) and Pt(II) mepirizole derivatives on pBR322 DNA by atomic force microscopy. *International Journal of Pharmaceutics* 245: 55-65.
- Olson, M. F. e Sahai, E. 2009. The actin cytoskeleton in cancer cell motility, *Clinical & experimental metastasis* 26(2), 73-87.
- O'Toole, S.A., Sheppard, B.L., McGuinness, E.P.J., Gleeson, N.C., Yoneda, M. e Bonnar, J. 2003. The MTS assay as an indicator of chemosensitivity/resistance in malignant gynaecological tumours. *Cancer Detection and Prevention* 27: 47-54.
- Orrenius, S. 2004. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicology Letters* 149(1-3): 19-23.
- Pang, R. W., J. W. Joh, P. J. Johnson, M. Monden, T. M. Pawlik e R. T. Poon. 2008. Biology of hepatocellular carcinoma. *Annals of Surgical Oncology* 15(4): 962-971.
- Palchaudhuri, R. e Hergenrother 2007. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Current Opinion in Biotechnology* 18: 497-503.
- Potter, J. D. 1999. Colorectal Cancer: Molecules and Populations. *Journal of the National Cancer Institute* 91(11): 916-932.
- Quella, S. K., L. L. Charles, Barton, D. L., Knost, J. A., Sloan, J. A., B. I. LaVasseur, D. Swan, K. R. Krupp, K. D. Miller, e P. J. Novotny. 2000. Evaluation of Soy Phytoestrogens for the Treatment of Hot Flashes in Breast Cancer Survivors: A North Central Cancer Treatment Group Trial. *Journal Clinical of Oncology*. 18: 1068-1074
- Qureshi, K. and G. A. Abrams (2007). "Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease." *World J Gastroenterol* 13(26): 3540-3553.

- Rankin, E. B. e A. J. Giaccia. 2008. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ* 15(4): 678-685.
- Ray, S., Bucur, O. e Almasan, A. 2005. Sensitization of prostate carcinoma cells to Apo2L/TRAIL by a Bcl-2 family protein inhibitor. *Apoptosis* 10:1411-1418.
- Reedijk, J. e Lohman, P.H.M. 1985. Cisplatin: synthesis, antitumour activity and mechanism of action.
- Ricci-Vitiani, L., D. G. Lombardi, E. Pillozzi, M. Biffoni, M. Todaro, C. Peschle, R. Maria. 2007. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 445: 111-115
- Rosenberg, B., Van Camp, L. e Krigas, T. 1965. Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* 205: 698-699.
- Russo, J., Y. F. Hu, X. Yang e I. H. Russo. 2000. Chapter 1: Developmental, Cellular, and Molecular Basis of Human Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2000(27): 17-37.
- Sabbadini, P. S., Assis, M.C., Trost, E., Gomes, D.L.R., Moreira, L.O., Santos, C.S., Pereira, G.A., Nagao, P.E., Azevedo, V.A.C., Júnior, R.H., Santos, A.L.S., Tauch, A. e Mattos-Guaraldi, A.L. 2012. *Corynebacterium diphtheriae* 67-72p hemagglutinin, characterized as the protein DIP0733, contributes to invasion and induction of apoptosis in HEP-2 cells. *Microbial Pathogenesis* 52: 165-176.
- Sawai, H. e Domae, N. 2011. Discrimination between primary necrosis and apoptosis by necrostatin-1 in Annexin V-positive/propidium iodide-negative cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 411: 569-573.
- Schwartz, J. D. e A. S. Beutler. 2004. Therapy for unresectable hepatocellular carcinoma: review of the randomized clinical trials-II: systemic and local non-embolization-based therapies in unresectable and advanced hepatocellular carcinoma. *Anticancer Drugs* 15(5): 439-452.
- Schweyer, S., Soruri, A., Meschter, O., Heintze, A., Zschunke, F., Miosge, N., Thelen, P., Schlott, T., Radzun, H.J. e Fayyazi, A. 2004. Cisplatin-induced apoptosis in human malignant testicular germ cell lines depends on MEK/ERK activation. *British Journal of Cancer* 91: 589-598.
- Seo S., Baye L.M., Schulz N.P., Beck J.S., Zhang Q., Slusarski D.C., Sheffield V.C. 2010. BBS6, BBS10, and BBS12 form a complex with CCT/TRiC family chaperonins and mediate BBSome assembly. 107:1488-1493.
- Sheng, H., J. Shao, S. Kirkland, P. Isakson, R. Coffey, M. J. B. R. D. e R. DuBois. 1997. Inhibition of Human Colon Cancer Cell Growth by Selective Inhibition of Cyclooxygenase-2. *The Journal of Clinical Investigation* 99: 2254–2259.
- Shi, Y. 2002. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. *Molecular Cell* 9: 459-470.
- Silva, J. F. P. 2012. Caracterização do Potencial Citotóxico e Mecanismos de Ação de um Complexo de Platina de Configuração trans em Células Animais. Tese de Mestrado.

- Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. (http://run.unl.pt/bitstream/10362/8688/1/Silva_2012.pdf).
- Silva, F. A., Borges, M., Ferreira, M. A. 1999. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*. 22: 94-103.
- Stiborova, M., Poljakova, J., Eckschlager, T., Kizek, R. e Frei E. 2012. Analysis of covalent ellipticine- and doxorubicin-derived adducts in DNA of neuroblastoma cells by the 32P-postlabeling technique. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký Olomouc Czechoslovakia Republic* 156: 115-121.
- Sochor, J., B. Ruttkay-Nedecky, P. Babula, V. Adam, J. Hubalek e R. Kizek. 2012. Automation of Methods for Determination of Lipid Peroxidation. *InTech*. 132-154.
- Song, Z. e H. Steller. 1999. Death by design: mechanism and control of apoptosis. *Programmes of cell suicide* 15: 49-50.
- Sousa, F.G. 2012. Efeito citotóxico do Olaparib em células de câncer colorretal: Estudo da influência de defeitos genéticos. Tese de Doutorado. Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. (<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/49268/000827943.pdf?sequence=1>)
- Surh, Y. J. 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer* 3(10): 768-780.
- Swain, S. M., F. S. Whaley and M. S. Ewer. 2003. Congestive Heart Failure in Patients Treated with Doxorubicin. *American Cancer Society* 97: 2869-2879.
- Swift, L. P., Rephaeli, A., Nudelman, A., Phillips, D.R. e Cutts, S.M. 2006. Doxorubicin-DNA Adducts Induce a Non-Topoisomerase II-Mediated Form of Cell Dead. *Cancer Research* 66: 4863-4871.
- Tait L, et al. Ultrastructural and immunocytochemical characterization of an immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Research*. 50: 6087-6094, 1990.
- Takahashi K, Suzuki K. Association of insulin-like growth-factor-I-induced DNA synthesis with phosphorylation and nuclear exclusion of p53 in human breast cancer MCF-7 cells. 1993. *Internacional Journal Cancer* 55: 453-458.
- Takashima, M., Kuramitsu, Y., Yokoyama, Y, Iizuka N., Fujimoto, M., Nishisaka, T., Okita, K., Oka, M., Nakamura, K. 2005. Overexpression of alpha enolase in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: Association with tumor progression as determined by proteomic analysis. *Proteomics*. 5: 1686–1692.
- Tan, X. W., e H. Xia. 2009. Induction of apoptosis in human liver carcinoma HepG2 cell line by 5-allyl-7-gen-difluoromethylenechrysin. *World Journal Gastroenterology* 15(18): 2234-2239.
- Tanaka, S., M. Mori, Y. Sakamoto, M. Makuuchi, K. Sugimachi. 1999. Biologic significance of angiopoietin-2 expression in human hepatocellular carcinoma. *The Journal of Clinical Investigation* 103(3): 341–345.

- Tapia, M. A., González-Navarrete, I., Dalmases, A., Bosch, M., Rodríguez-Fanjul, V., Rolfe, M., Ross, J. S., Mezquita, J., Mezquita, C., Bachs, O., Gascón, P., Rojo, F., Perona, R., Rovira, A. e Albanell, J. 2007. Inhibition of the Canonical IKK/NFkB Pathway Sensitizes Human Cancer Cells to Doxorubicin. *Cell Cycle* 6(18): 2284-2292.
- Teyssot, M., Jarrousse, A., Chevry, A., Beaudoin, C., Manin, M., Nolan S., Díez-González, S., Morel, L., Gautier, A. 2009. Toxicity of Copper (I)-NHC Complexes Against Human Tumor Cells: Induction of Cell Cycle Arrest, Apoptosis, and Cleavage DNA. *Chemistry A European Journal*. 15: 314-318.
- Thorgeirsson, S. S. e J. W. Grisham. 2002. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nature Genetics* 31: 339-346.
- Van der Meer, F., Faber D. J., Aaders M. C. G., Ploot A. A., Vermes T., Leeuwen V. 2010. Apoptosis- and necrosis-induced changes in light attenuation measured by optical coherence. *Lasers Medical Science* 25: 259-267.
- Wang, D.-L., Qi, F.-H., Xu, H.-L., Inagaki, Y., Orihara, Y., Sekimizu, K., Kokudo, N., Wang, F.-S. e Tang, W. 2010. Apoptosis-induced activity of compounds screened and characterized from cinobufacini by bioassay-guided isolation. *Molecular Medicine Reports* 3: 717-722.
- Weiske J., Huber, O. 2005. The histidine triad protein Hint1 interacts with Pontin and Reptin and inhibits TCF-beta-catenin-mediated transcription. *Journal Cell Scientific* 118:3117-3129
- Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W. W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., Kalyanaraman, B., Mutlu, G. M., Budinger, G. R. S. e Chandel, N. S. 2010. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(19): 8788-8793.
- WHO 2012. http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer_text/en/index.html (Acedido em Junho de 2012).
- Wilkes, G. e K. Hartshorn. 2009. Colon, retal, and anal cancers. *Semin Oncgy Nursing* 25(1): 32-47.
- Wong, E. e Giandomenico, C.M. 1999. Current Status of Platinum-Based Antitumor Drugs. *Chemical Reviews* 99: 2451-2466.
- Wu, C. 1995. Heat shock transcription fators: structure and regulation. *Annual review of cell and developmental biology* 11: 441-69.
- Yan, L. H. e Hong, Z. 2013. Proteome analysis for profiling infertility markers in male mouse sperm after carbon ion radiation. *Toxicology*.
- Yan, Y., Chun, B.J., Zhong, L.X., Ying, Z., Ya, S. e Ping, L.Z. 2012. Oxidative Stress and Apoptotic Changes of Rat Cerebral Cortical Neurons Exposed to Cadmium in Vitro. *Biomedical and Environmental Sciences* 25: 172-181.
- Yang H. Y., Wen, Y. Y., Chen, C. H., Lozano, G., Lee, M. H. 2003. 14-3-3sigma positively regulates p53 and supresses tumor growth. *23(20): 7096-7107*.

- Zhang, H., S. Zhang, H. He, W. Zhao, K. Ren, J. Chen, R. Shao. 2011. RasGAP-derived peptide 38GAP potentiates the cytotoxicity of cisplatin through inhibitions of Akt, ERK and NF- κ B in colon carcinoma HCT116 cells. *Cancer Letters* 308: 62-70.
- Ziegler, U. e Groscurth, P. 2004. Morphological Features of Cell Death. *Physiology* 19: 124-128

Anexo

Anexo I – Poster intitulado de *Anti-proliferative activity and biological targets of Pt(II) and Cu(II) compounds*